

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Determinación de la tasa de infección de ADN de kinetoplasto en vectores y posibles vectores de leishmaniasis en cinco provincias del Ecuador

Proyecto de Investigación

Edna Rubí Basantes Arias

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 20 de diciembre de 2017

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES**

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Determinación de la tasa de infección de ADN de kinetoplasto en vectores y
posibles vectores de leishmaniasis en cinco provincias del Ecuador**

Edna Rubí Basantes Arias

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata Mena, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 20 de diciembre de 2017

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Edna Rubí Basantes Arias

Código: 00025300

Cédula de Identidad: 1003863204

Lugar y fecha: Quito, 20 de diciembre de 2017

DEDICATORIA

A mis padres y familia por su apoyo incondicional, especialmente a mi madre Teresa,
por ser mi fuerza, estar para mí en todo momento y cuando más lo he necesitado.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad San Francisco de Quito y al Instituto de Microbiología por haberme acogido en sus instalaciones y permitirme realizar mi trabajo de investigación.

Un especial agradecimiento a Sonia Zapata, por darme las herramientas necesarias para el desarrollo de la investigación y mil gracias por la paciencia infinita.

A mis profesores, Pablo Riera, Sonia Zapata, Lourdes Torres, Danny Navarrete, Renato León, Marcelo Albuja, Venancio Arahana, Javier Torres, Guillermo Hernández, José Álvarez y Martha Yépez, quienes compartieron su tiempo, sus conocimientos y experiencias que enriquecieron mi formación.

A Byron Mullo, Andrea Torres y Kat Salazar, por haberme guiado en el inicio de mi investigación y un agradecimiento muy especial a Jorge Chiriboga, por su amistad, enseñanzas y ayuda incondicional en el transcurso de mi trabajo.

A mis Amigos con quienes compartí grandes y buenos momentos: Ivanova T, Lore O, Giss S, José B, Lore M, Anita S, Sully M, Fernanda L, Irina V, Fernando H, Cris Ch, Deysita P, Doña Mary, y a todos los "Biotecs", especialmente a David Salomón, Juan Delgado, Anita Samaniego y Liseth Salazar que son amigos únicos e incomparables y gracias por su amistad a todos los que conocí en las diferentes clases que tomé en la Universidad.

Finalmente, con un cariño especial, les agradezco a mi familia por su apoyo infinito, aconsejarme y ser mi fortaleza para vencer todos los obstáculos.

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica, transmitida por dípteros de la subfamilia Phelebotominae. En Ecuador, se encuentra en 22 de las 24 provincias. El primer caso de leishmaniasis cutánea en Ecuador se reportó en 1920, años más tarde se realizaron estudios enfocados en taxonomía, fauna y ecología del vector, así como también en transmisión, diagnóstico y prevalencia de la leishmaniasis. Actualmente, algunas actividades humanas como la deforestación, agricultura, urbanización, entre otras, han generado una redistribución de especies de flebótomos, por lo tanto, es importante investigar la presencia de *Leishmania* en especies vectoras y posibles vectoras para entender la dinámica de transmisión del parásito en zonas endémicas de leishmaniasis. El objetivo principal de este trabajo fue determinar la presencia de ADN del kinetoplasto de *Tripanosomatidae* (ADNk) mediante PCR en Tiempo Real en 325 especímenes pertenecientes a 11 especies de flebótomos colectados en las localidades de Santo Domingo de Onzole y La Tablada en Esmeraldas. Pedernales, El Carmen, Junín y Chone en Manabí. Caluma y Echeandía en Bolívar, Paraíso Escondido en Pichincha y en la Estación de Biodiversidad Tiputini en Orellana. Los resultados mostraron que la tasa de infección con ADNk fue del 18.2 % de los cuales el 2.2% de las especies estuvieron infectadas con ADN de *Leishmania guyanensis* y el 16% con *Endotrypanum*. Según estudios previos es la primera vez que *Psychodopygus carrerai thula* y *Pintomyia serrana* están infectadas por *Leishmania guyanensis*. En Ecuador estas especies aún no se reportan como vectores de *Leishmania*.

PALABRAS CLAVE: *Leishmania*, ADNk, HSP70, flebótomos, Ecuador.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a zoonotic disease transmitted by Diptera from the subfamily Phlebotominae. In Ecuador, the disease is found in 22 of the 24 provinces. The first case of cutaneous leishmaniasis in Ecuador was reported in 1920. Years later, some studies about taxonomy, fauna and ecology of the vector, as well as transmission, diagnosis and infection prevalence were carried out. Currently, human activities such as deforestation, agriculture, urbanization, among others, have generated a redistribution of sandfly species. So it is important to investigate the presence of *Leishmania* in vector and possible vector species, to understand the parasite's transmission dynamics in endemic areas. This work's main goal was to determine the presence of Trypanosomatidae kinetoplast DNA (kDNA) by Real Time PCR in 325 specimens belonging to 11 species of sandflies, collected in the localities of Santo Domingo de Onzole and La Tablada in Esmeraldas; Pedernales, El Carmen, Junín and Chone in Manabí; Caluma and Echeandía in Bolívar; Paraiso Escondido in Pichincha and in the Tiputini Biodiversity Station in Orellana. The results showed that the infection rate was 18.2%, from which the 2.2% of the species were infected with *Leishmania guyanensis* and 16% with *Endotrypanum*. According to previous studies, it is the first time that *Psychodopygus carrerai thula* and *Pintomyia serrana* are reported to be infected by *Leishmania guyanensis*. In Ecuador, these species are not yet reported as *Leishmania* vectors.

KEYWORDS: *Leishmania*, kDNA, HSP70, sandflies, Ecuador.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Leishmaniasis en Ecuador	12
1.2. Epidemiología de la leishmaniasis en los últimos diez años en Ecuador	13
1.3. El Parásito	14
1.3.1. <i>Leishmania</i>	14
1.3.2. <i>Endotrypanum</i>	15
1.4. El Vector	16
1.5. Vectores de <i>Leishmania</i> en Ecuador	17
1.6. Reservorios de <i>Leishmania</i>	18
1.7. Métodos de detección molecular de <i>Leishmania</i> en vectores	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo Principal	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. ÁREA DE ESTUDIO	24
5. MATERIALES	25
5.1. Separación de especímenes	25
5.2. Disección y montaje en placa de especímenes	25
5.3. Secado de placas	26
5.4. Identificación de especímenes	26
5.5. Extracción de ADN	26
5.6. Amplificación de ADNk en PCR a Tiempo Real (qPCR)	27
5.7. Amplificación de ADN k en PCR Convencional	27
5.8. Electroforesis en Gel de Agarosa	28
5.9. Secuenciamiento	28
5.10. Análisis de Secuencias	29

6. MÉTODOS	29
6.1. Colección entomológica y separación de especímenes	29
6.2. Montaje en placa y secado de placas	29
6.3. Identificación Taxonómica de Especímenes	30
6.4. Extracción de AND	30
6.5. Amplificación de una region conservada (120pb) de los minicírculos de ADNk de <i>Tripanosomatidae</i> mediante PCR en Tiempo Real	31
6.6. Amplificación de una region conservada (120pb) de los minicírculos de ADNk de <i>Tripanosomatidae</i> mediante PCR Convencional	32
6.7. Amplificación de un fragment del gen de la Proteína del Shock Térmico HSP70 mediante PCR Convencional	32
6.8. Electroforesis en gel de Agarosa	32
6.9. Secuenciamiento	33
6.10. Análisis de secuencias	33
7. RESULTADOS	33
7.1. Colectas entomológicas	33
7.2. Amplificación de una region conservada (120pb) de los minicírculos de ADNk de <i>Tripanosomatidae</i> mediante PCR en Tiempo Real y Convencional	34
7.3. Amplificación de un fragmento del gen de la Proteína del Shock Térmico HSP70	34
7.4. Análisis de secuencias y Tasa de infección	34
8. DISCUSIÓN	35
9. CONCLUSIONES	43
10. RECOMENDACIONES	44
11. BIBLIOGRAFÍA	45
12. TABLAS	52
13. FIGURAS	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de <i>Leishmania</i> causantes de Leishmaniasis cutánea y mucocutánea en Ecuador.....	52
Tabla 2. Reservorios de <i>Leishmania</i> en América.	53
Continuación Tabla 2. Reservorios de <i>Leishmania</i> en América.	54
Tabla 3. Reacción de PCR para la amplificación de una región de los minicírculos del Kinetoplasto de <i>Tripanosomatidae</i> mediante PCR en Tiempo Real.	54
Tabla 4. Condiciones de PCR en Tiempo Real (qPCR) para la amplificación de un región de los minicírculos del kinetoplasto de <i>Tripanosomatidae</i>	55
Tabla 5. Reacción de PCR para la amplificación de una región de los minicírculos del Kinetoplasto de <i>Tripanosomatidae</i> mediante PCR Convencional.....	55
Tabla 6. Condiciones de PCR Convencional para la amplificación de una región de los minicírculos del kinetoplasto de <i>Tripanosomatidae</i>	56
Tabla 7. Reacción de PCR para la amplificación de un fragmento del gen de la proteína del shock térmico HSP70 mediante PCR Convencional.	56
Tabla 8. Condiciones de PCR Convencional para la amplificación de un fragmento del gen de la proteína del shock térmico HSP70.....	57
Tabla 9. Resumen de los especímenes hembras colectados en cinco provincias del Ecuador.....	57
Tabla 10. Número de especímenes utilizados para el análisis molecular por Provincia.	58
Tabla 11. Número de Pools procesados en PCR en Tiempo Real.....	59
Tabla 12. Lista de especies positivas para ADNk y HSP70 por provincia.....	60
Continuación Tabla 12. Lista de especies positivas para ADNk y HSP70 por provincia.	61
Tabla 13. Lista de especies infectadas con ADN de <i>Endotrypanum</i>	62
Tabla 14. Lista de especies infectadas con ADN de <i>Leishmania</i>	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Epidemiología de la Leishmaniasis cutánea en Ecuador 1994-2015.....	63
Figura 2. Distribución Geográfica de cinco especies de <i>Leishmania</i> en Ecuador. Las áreas de color gris oscuro muestran la meseta andina (> 1.000 m de altitud) y las áreas de color gris claro muestran la selva alta o laderas andinas (400-1.000 m de altitud)..	63
Figura 3. Principales criterios utilizados para la identificación morfológica. Las estructuras corresponden a la especie <i>Nyssomyia trapidoi</i>	64
Figura 4. Curva de Derretimiento a 81°C que muestra la presencia de ADN del Kinetoplasto de Tripanosomatidae.	64
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de la amplificación de una región conservada de los Minicírculos del Kinetoplasto de <i>Tripanosomatidae</i>	65
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de la amplificación de un fragmento del gen de la proteína del Shock Térmico (2 muestras). El control positivo fue la muestra de una lesión de Leishmaniasis cutánea.	65
Figura 7. Árbol filogenético obtenido a través del método Neighbor-Joining para determinar la especie de <i>Leishmania</i> que infecta al vector y posible vector.....	66
Figura 8. Árbol filogenético obtenido a través del método Neighbor-Joining para determinar que parásito infecta al vector y posible vector (Muestra CDC16 es un <i>Endotrypanum</i> confirmado).....	66

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Leishmaniasis en Ecuador

La Leishmaniasis es una enfermedad parasitaria zoonótica producida por un parásito del género *Leishmania* que se transmite por la picadura de insectos dípteros hematófagos de la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae* (Vásquez, 2011). En Ecuador la enfermedad es considerada como un problema de salud pública debido a que en los últimos años su incidencia ha ido en aumento. La enfermedad es endémica en la mayoría de las provincias de la región costera del Pacífico, en la Amazonía, y en algunos Valles Interandinos. La leishmaniasis se presenta en tres formas clínicas: cutánea, mucocutánea y visceral, de las cuales, la leishmaniasis cutánea se encuentra distribuida en casi todo el Ecuador, mientras que la forma mucocutánea parece estar restringida a la región amazónica y la forma visceral, no ha sido confirmada, aunque en 1949 se registró una forma de leishmaniasis visceral, a partir de este único reporte probablemente mal diagnosticado, no se ha presentado, ni confirmado esta forma de leishmaniasis, a pesar de existir en países vecinos como Colombia (Calvopiña, et al., 2004).

Por su parte, Hashiguchi y Gómez (1991), mencionan que en Ecuador, la leishmaniasis cutánea en humanos fue reportada por primera vez en 1920. Por otro lado, Heinert (1991), reporta que la leishmaniasis mucocutánea apareció por primera vez en 1924 y se reportó en el Hospital General de Guayaquil. De igual forma, los estudios relacionados a la taxonomía, fauna y ecología del vector de la enfermedad se realizaron en 1950 y estudios de la transmisión se dio en 1982 para identificar vectores con infección de *Leishmania* (Hashiguchi, et al., 2017).

En Ecuador, la incidencia de casos de leishmaniasis en las diferentes zonas está relacionada a cambios de temperatura y humedad. Se ha visto que en la Amazonía

la enfermedad tiene una incidencia mayor en la época lluviosa de Marzo a Agosto. En la zona norte de la Cordillera de los Andes que implica: Puerto Quito, Pedro Vicente Maldonado y Los Bancos, pertenecientes a Pichincha, existe una mayor incidencia en la época lluviosa de Octubre a Enero y en la zona del sur de la Cordillera: Paute y Azuay se reporta una mayor ocurrencia de Febrero a Julio (Hashiguchi, et al., 2017).

1.2. Epidemiología de la leishmaniasis en los últimos diez años en Ecuador

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la leishmaniasis es una enfermedad no controlada y en expansión debido a que está presente en 98 países, afectando a un tercio de la población mundial (Restrepo, et al., 2011). En Ecuador, en 2014 la leishmaniasis se encontró distribuida en 22 de las 24 provincias, con excepción de Galápagos y Tungurahua, de acuerdo al Anuario de Vigilancia Epidemiológica de Ecuador desde el año 1994 hasta el 2015, ha existido fluctuaciones en los casos de leishmaniasis. Se mencionó que los años 1996, 2000 y 2004 son los que más casos de la enfermedad han presentado: 1626 (14.49%), 2830 (22.38%) y 2638 (20.25%) respectivamente y el año 1998 es el que menos casos presenta con 674 (5.54%) (Figura 1). Cabe mencionar que anualmente hay casos de leishmaniasis asintomáticos o no reportados que no forman parte de la incidencia mencionada, por lo que el número de casos reales puede ser mayor y la falta de reportes reduce la eficiencia en el control de la enfermedad, a pesar que desde el año 2005 la leishmaniasis es una enfermedad de notificación obligatoria (Hashiguchi, et al., 2017).

Por su parte, el aumento o disminución de los casos de leishmaniasis, no sólo en Ecuador puede atribuirse a los cambios en el uso del suelo, la construcción de

nuevas vías y los patrones de actividad humana Como la migración, deforestación, lo que lleva a aumentar la exposición de los humanos a los ciclos de vida zoonóticos de la *Leishmania* (Desjeux, 2001).

1.3. El Parásito

1.3.1. *Leishmania*

La *Leishmania* es un protozoario de la familia Trypanosomatidae y perteneciente al género *Leishmania*. Este género se divide en dos subgéneros: el primero es *Leishmania* que incluye a las especies que se desarrollan en el intestino anterior y medio del vector, y el segundo es *Viannia* que se desarrolla en el intestino posterior y medio del vector (Lainson & Shaw, 1987).

El parásito presenta un ciclo de vida que incluye dos estados, por lo que requiere de dos hospederos, el primero es un invertebrado que son los flebótomos y el segundo es un vertebrado (mamífero). El parásito cuando se encuentra en el vector está como promastigote extracelular móvil, presenta una forma alargada con un cilio anterior, mientras que en el hospedador mamífero está como amastigote intracelular inmóvil y tiene una forma esférica, con un cilio muy corto, (Kato, et al., 2010).

Posterior a la picadura del vector, los neutrófilos son reclutados a los sitios donde hay daño de tejido, se encargan de fagocitar la mayor cantidad de parásitos y juegan un papel importante en el establecimiento de la infección (Kato, et al., 2010).

Cuando el parásito está dentro del hospedador humano, empieza a reproducirse por mitosis y eso genera la lisis celular y el daño en los tejidos (Azpura, et al., 2010).

A nivel mundial se han reportado varias especies de *Leishmania* como *L. (Leishmania) major*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (Viannia) peruviana*, *L. (Leishmania) amazonensis* y *L. (Leishmania.) trópica*, estas

especies son las responsables de producir la leishmaniasis cutánea. De igual forma, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *L.* (*Viannia*) *panamensis*, generan la leishmaniasis mucocutánea y cutánea. Por último la leishmaniasis visceral es producida específicamente por *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum* (Bañuls, et al., 1999; Killick-Kendrick, 1990).

En Ecuador, ocho son las especies de *Leishmania* que han sido identificadas como agentes causantes de leishmaniasis cutánea y mucocutánea, *Leishmania mexicana*, *L.* (*L.*) *amazonensis*, *L.* (*L.*) *major*, *L.* (*V.*) *guyanensis*, *L.* (*V.*) *panamensis*, *L.* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*V.*) *naiffi*, y *L.* (*V.*) *lainsoni*, (Tabla 1), (Figura 2), (Kato, et al., 2016).

1.3.2. *Endotrypanum*

Es un parásito perteneciente a la familia Trypanosomatidae, está altamente emparentado con *Leishmania* y debido a esto su identificación es complicada, en Ecuador *Endotrypanum schaudinni* y *Endotrypanum monterogeii* son las dos únicas especies reportadas (Katakura, et al., 2003). Por su parte, la infección por *Endotrypanum* se da únicamente en animales silvestres como los perezosos (Silveira, et al., 1998). Los organismos del género *Endotrypanum* son los únicos del grupo Kinetoplastida que infectan los eritrocitos de algunos mamíferos con excepción de los humanos; en los humanos no puede causar infección, ya que, no se ha encontrado evidencia que *Endotrypanum* tenga la capacidad de evitar su destrucción por macrófagos (Franco, et al., 2000).

Por su parte, estudios han identificado la infección con promastigotes de *Endotrypanum* en *Nyssomyia trapidoi* y *Lutzomyia hartmanni* en diferentes áreas de las provincias del Ecuador (Hashiguchi, et al., 2017).

1.4. El Vector

Los flebótomos son dípteros hematófagos pertenecientes a la familia Psychodidae y a la subfamilia Phlebotominae. Su longitud es de 2-3 mm, son de color gris amarillento o amarillo pálido, el cuerpo y las alas están cubiertas de pelos, las antenas son largas y delgadas y presentan una probóscide más larga que la cabeza (Cabrera *et al.*, 2009; Davies *et al.*, 2000).

De acuerdo a Cáceres (1995), el ciclo biológico de los flebótomos es muy variado, depende de la especie y de las condiciones de humedad, temperatura y alimento. Se conoce que las especies selváticas necesitan mayor número de días para completar su ciclo, en comparación con las especies de los Andes. Los vectores tienen 4 estadios: huevo, larva, pupa y adulto. Los huevos son pequeños, oscuros y ovalados, incuban durante seis a doce días. El estado larval comprende cuatro estadios que necesitan entre 20 a 60 días para su desarrollo, en este estado se alimentan de materia orgánica en descomposición y la escasez o ausencia de iluminación son factores favorables para su desarrollo. La pupa tiene un ciclo de siete a catorce días y principalmente hay el cambio de color de blanco a pardo oscuro. El adulto tiene un período de vida de 20 a 30 días. Cada hembra pone entre 20 a 100 huevos, que son depositados en huecos de los árboles, fisuras y grietas de rocas desprendidas, piso de establos, madrigueras de vertebrado y en cuevas. Los insectos adultos tienen una vida corta de alrededor de un mes; son muy activos al atardecer y en la noche, durante el día se esconden en agujeros o aberturas de terrenos y prefieren evitar el viento y la luz, para buscar su alimento vuelan únicamente 50m a la redonda de los lugares de reproducción, su distancia de vuelo es corta y rara vez sobrepasan los 150cm de altura (Cabrera, et al, 2009). Es importante mencionar que el tiempo de vida de un flebótomo disminuye cuando

tiene una carga parasitaria pero debe sobrepasar los 15 días de vida, ya que el parásito que infecta necesita de aproximadamente estos días para formar el promastigote (Cáceres, 1995).

Por su parte, la distribución a nivel mundial es en regiones tropicales y subtropicales. Existen más de 800 especies de flebótomos pertenecientes a 5 géneros: *Phlebotomus* (94 especies), *Sergentomyia* (258 especies), *Lutzomyia* (379 especies), *Brumptomyia* (23 especies) y *Warileya* (5 especies). Actualmente, cerca de 80 especies de los géneros *Lutzomyia*, *Phlebotomus* y *Sergentomyia* están implicados en la transmisión del parásito de la *Leishmania* (Kato, et al., 2010).

Los flebótomos tienen una alta capacidad de adaptación y hoy en día, las diferentes actividades humanas están contribuyendo a que exista una redistribución de especies, por lo tanto, los casos de leishmaniasis están en aumento (Valderrama, et al., 2011).

1.5. Vectores de *Leishmania* en Ecuador

En Ecuador se han reportado hasta el momento 76 especies de flebótomos que pertenecen a 17 subgéneros, de los cuales: *Nyssomyia trapidoi*, *Lutzomyia hartmani*, *Lutzomyia gomezi* y *Lutzomyia ayacuchensis* son vectores confirmados de *Leishmania* (Zapata, et al., 2012), (Kato, et al., 2016). Sin embargo, *Pintomyia serrana* podría ser vector de *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* y *Leishmania panamensis*, aunque todavía no se confirma que esta especie transmita la enfermedad (Calvopiña, et al., 2004). Por su parte, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia olmeca olmeca*, *Lutzomyia olmeca bicolor*, *Psychodopygus panamensis* y *Psychodopygus carrerai carrerai* han sido identificados como posibles vectores (Hashiguchi, et al., 2017).

En cuanto a las especies vectoras, *Nyssomyia trapidoi* transmite *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis* y se encuentran distribuidas en la Costa del Pacífico y la Cordillera de Los Andes, *Lutzomyia ayacuchensis* es vector de *L. (L.) mexicana* y se encuentran en el Valle de Los Andes y *Lutzomyia tortura* podría ser vector de *L. (V.) naiiffi* y se encuentra en la Amazonía (Hashiguchi, et al., 2017).

1.6. Reservorios de *Leishmania*

Los reservorios son especies de vertebrados que tienen la capacidad de mantener un parásito en la naturaleza (Jansen & Roque, 2010). Las especies que son reservorios deben cumplir con un patrón ecológico conocido como la regla 20/80, la misma que establece que solo el 20% de un grupo de especies debe ser infectadas por el parásito (Miller & Hupper, 2013; Woolhouse *et al.* 1997).

Actualmente no se conoce con exactitud todas las especies que actúan como reservorios, pero el estudio realizado por Roque y Jansen (2014) muestra una lista de especies que son reservorios (Tabla 2). Estos reservorios pertenecen a los órdenes: *Didelphimorphia*, *Pilosa*, *Cingulata*, *Rodentia*, *Carnivora*, *Primata* y *Chiroptera* y en Ecuador los reservorios reportados son: *Choloepus hoffmanni*, *Choloepus didactylus*, *Tamandua tetradactyla*, *Sciurus granatensis*, *Potos flavus* (Grimaldi, 1992).

De igual forma, los estudios moleculares realizados por Palacios (2015), estableció que las preferencias tróficas de los flebótomos son: *Equus caballus*, *Capra hircus*, *Bos taurus* y animales silvestres como *Choloepus hoffmanni*, *Pecari tajacu*, *Potos flavus*, *Cebus capucinus*, *Tapirus terrestres*.

1.7. Métodos de detección molecular de *Leishmania* en vectores

El método convencional para identificar a *Leishmania* es la observación de promastigotes en las glándulas salivales del flebótomo o a través de cultivos del parásito. Sin embargo, estos métodos de detección, no permiten diferenciar a *Leishmania* de *Endotrypanum*, por lo que puede conducir a errores. En los últimos años, los avances en biología molecular han abierto la posibilidad de desarrollar herramientas específicas que proporcionan una mayor sensibilidad al momento de detectar e identificar a *Leishmania*. Una de esas herramientas es la PCR ligada al secuenciamiento de ciertos segmentos cromosómicos. Existen varios marcadores moleculares que detectan e identifican a *Leishmania*, uno de ellos es, 7SL ARN que permite observar la similitud entre las secuencias de *Leishmania*, permite la construcción de árboles filogenéticos y agrupa los parásitos del género *Leishmania* a nivel de subgénero (Cárdenas, et al., 2012). Otro marcador molecular es ITS (Espaciadores Internos de la Transcripción) del ADN ribosomal, utilizados con fines taxonómicos dentro del género *Leishmania*, 18S (Subunidad pequeña del ARN ribosomal) utilizado en estudios filogenéticos, GP63 gen que codifica para la glicoproteína de 63kDa que es un factor de virulencia que le permite a *Leishmania* invadir los tejidos y producir la enfermedad y CPB gen que codifica a la cisteinoproteasa B que es un factor de virulencia que produce *Leishmania* (Montalvo, et al., 2012). En sí existen muchos más marcadores y herramientas moleculares, pero en este estudio se utilizará dos marcadores; el primero es una región del kinetoplasto y el segundo el gen de la proteína de shock térmico (HSP70). El kinetoplasto es una masa extranuclear densa, que se encuentra dentro de la doble membrana de una gran mitocondria, está formando por una red concatenada de maxicírculos y minicírculos, tiene ADN único y se

caracteriza por tener un alto número de copias de minicírculos; aproximadamente 10000 copias por parásito. En el caso de darse la amplificación de los minicírculos, ésta amplificación permite discriminar entre el subgénero *Viannia* y *Leishmania*, debido a que se amplifica una subpoblación específica de minicírculos (Ceccarelli, 2014). Por su parte, el segundo marcador es HSP70, que permite identificar la especie de *Leishmania* es una proteína que se ha conservado a lo largo de la evolución. Se encuentran implicada en procesos esenciales para la célula, como el plegamiento de proteínas recién sintetizadas, degradación de proteínas inestables y control de la actividad de otras proteínas reguladoras (Mayer y Bukau, 2005). Su estructura se caracteriza por la presencia de un dominio de unión a ATP en la mitad amino terminal, y una parte carboxilo terminal responsable de la unión a polipéptidos. Su actividad se basa en la unión controlada por la hidrólisis de moléculas de ATP, a segmentos peptídicos hidrófobos (Haslbeck, 2005). Durante la transmisión de *Leishmania*, el parásito pasa por dos situaciones de estrés como el aumento de temperatura y el descenso de pH; estos factores, son los desencadenantes del proceso de diferenciación de promastigote a amastigote que conlleva toda una serie de cambios en los patrones de expresión génica (Garlapati, 1999). En el insecto poiquilotermino los promastigotes se encuentran a 22-28°C, tras su transmisión al hospedador mamífero homeotermino quedan expuestos a 31-35°C en el caso de las especies cutáneas, o a 37°C en el caso de las especies viscerales. Por tanto, para asegurar su supervivencia en el mamífero, la proteína HSP70 le permite a *Leishmania* adquirir mecanismos de termotolerancia y respuesta al choque térmico (Lawrence, 1985).

Finalmente, en el presente estudio se determinará la tasa de infección de ADNk de *Tripanosomatidae* en muestras recolectadas en cinco provincias del Ecuador a

través de la amplificación de los minicírculos del Kinetoplasto y de la amplificación de un fragmento del gen de la proteína del Shock Térmico por PCR en Tiempo Real y PCR.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Principal

- Determinar la presencia de ADN de kinetoplasto (ADNk) de *Tripanosomatidae* en 11 especies de flebótomos capturados en diferentes localidades de las provincias de Orellana, Manabí, Bolívar, Pichincha y Esmeraldas.

2.2. Objetivos Específicos

- Seleccionar especímenes hembras pertenecientes a las subtribus Psychodopygina y Lutzomyiina de la clasificación de Galati 2011.
- Identificar a nivel de especie a través del uso de las claves taxonómicas de Galati (2011) y Young (1994).
- Amplificar una región conservada (120pb) de los minicírculos de ADN del kinetoplasto de *Tripanosomatidae* en las especies de interés.
- Identificar la especie de *Leishmania* por medio de la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen de la proteína del shock térmico (HSP70).
- Determinar la tasa de infección con ADNk de *Tripanosomatidae* en las especies seleccionadas.

3. JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad emergente y en expansión que se encuentra distribuida en 22 de las 24 provincias del Ecuador, con excepción de Galápagos y Tungurahua. Actualmente, existen zonas endémicas de leishmaniasis y este problema surge, por que los vectores están infectados con *Leishmania* (alrededor del 1%), presencia de reservorios y contacto con el humano. Un porcentaje de infección bajo es suficiente para mantener la enfermedad y causar la enfermedad. Además, la leishmaniasis en Ecuador y a nivel mundial es cíclica; es decir: un año aparece y en el siguiente año no hay presencia de casos. Por lo que, realizar este estudio, permitirá conceder a las diferentes Autoridades de Salud, herramientas e información pertinente, a partir de las cuales, ellos podrán realizar las colectas entomológicas necesarias, analizarlas y así, predecir en qué época del año habrá la presencia de *Leishmania*, con la finalidad de informar a las poblaciones que cierta temporada es peligrosa, porque se ha encontrado una alta infección de flebótomos con el parásito. Finalmente, la detección de la tasa de infección con ADNk en flebótomos de zonas endémicas de leishmaniasis permitirá entender la dinámica de transmisión de la enfermedad e identificar especies relacionadas con la transmisión del parásito, así como evaluar el riesgo del incremento de leishmaniasis en zonas específicas.

4. ÁREA DE ESTUDIO

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Parasitología y Vectores de la Universidad San Francisco de Quito, Campus Cumbayá.

Las muestras fueron colectadas durante los años 2013 y 2014 en cinco provincias del Ecuador: Esmeraldas, Bolívar, Manabí, Pichincha y Orellana. En Esmeraldas las colectas entomológicas se realizaron en la Localidad de Santo Domingo de Onzole y en el Recinto La Tablada. En Bolívar se colectó en el bosque secundario templado de Caluma y Echeandía. En Manabí se colectó en los bosques secundarios subtropicales de Pedernales, El Carmen, Junín y Chone. En Orellana en la Estación de Biodiversidad Tiputini de la Universidad San Francisco de Quito. Finalmente, en Pichincha se colectó en Pedro Vicente Maldonado en la localidad de Paraíso Escondido.

5. MATERIALES

5.1. Separación de especímenes

- Tubos Crio de tapa rosca de 2ml
- Algodón
- Pinzas entomológicas
- Cajas Petri plásticas
- Estéreo microscopio (LEICA EZ4)
- Congelador (Mabe)
- Cajas de cartón con divisiones para guardar los tubos Crio

5.2. Disección y montaje en placa de especímenes

- Portaobjetos (Medic-life 25.4 x 76.2 mm)
- Cubreobjetos redondos de 12mm
- Pinzas entomológicas
- Pipetas Pasteur
- Jeringas (BiosoluGen 1ml/cc)
- Aguja (NIPRO 30G*1/2)
- Etanol al 70%
- Tupos Eppendorf 1,5ml
- Solución Marc André (Hidrato Cloral 40%, y ácido acético 30%)
- Goma cloral (Hidrato Cloral 30%, Goma Arábica 20% y Glicerina 13%)
- Fosforera
- Microscopio óptico (LEICA DME)
- Estéreo microscopio (LEICA EZ4)

5.3. Secado de placas

- Estufa (BIOBASE)
- Placas de montaje de especímenes

5.4. Identificación de especímenes

- Placas de especímenes
- Microscopio óptico (LEICA DME)
- Claves Taxonómicas (Young y Duncan, 1994., Galati, 2010)

5.5. Extracción de ADN

- PBS 1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 1.4mM KH₂PO₄, pH7)
- CTAB (CTAB 2% p/v, NaCl 1.4M, EDTA 20Mm pH 8, HCl 100Mm pH 8)
- Proteinasa K (Invitrogen)
- Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)
- Etanol al 100% y 70%,
- Buffer TE (10mM Tris-HCl, pH 8, 0.1mM EDTA)
- Microcentrifugadora Eppendorf ®
- Vortex (SMENSMAURO LAB MIXER)
- Baño de arena (Thermolyne)
- Tubos Eppendorf 1,5ml
- Pistilos plásticos (Axigen 1.5ml x 2.0 ml)
- Micropipetas (Thermo Scientific)
- Muestra de abdomen de especímenes

5.6. Amplificación de ADNk en PCR a Tiempo Real (qPCR)

- Agua para PCR
- SsoFast™ EvaGreen® Supermix BioRad™
- Primer JW11 (50mM): 5'-CCT ATT TTA CAC CAA CCC CCA GT -3'
- Primer JW12 (50mM): 5'-GGG TAG GGG CGT TCT GCG AAA -3'
- PCR Strips Tubes de 0.2 mL (Axigen Strips PCR-0208-C)
- Muestras de ADN de especímenes
- Controles positivos (Muestras de ADN de Biopsias cutáneas de Leishmaniasis)
- Micropipetas (Thermo Scientific)
- Termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR BioRad

5.7. Amplificación de ADN k en PCR Convencional

- Agua para PCR
- Buffer 5X (Promega)
- MgCl₂ 25mM (Promega)
- dNTPs 2mM (Promega)
- Primer JW11 (50mM): 5'-CCT ATT TTA CAC CAA CCC CCA GT -3'
- Primer JW12 (50mM): 5'-GGG TAG GGG CGT TCT GCG AAA -3'
- Primer HSP70 sen (10mM): 5'- GACGGTGCCTGCCTACTTCAA -3'
- Primer HSP70 antisen (10mM): 5'- CCGCCCATGCTCTGGTACATC -3'
- Taq Polimerasa (GoTaq ®)
- Tubos Eppendorf de 0,2ml
- Muestras de DNA del abdomen de especímenes

- Controles positivos (Muestras de ADN de Biopsias de Leishmaniasis cutánea)
- Termociclador (BIORAD).

5.8. Electroforesis en Gel de Agarosa

- Cámara de electroforesis horizontal (C.B.S Scientific CO)
- TBE 1X
- Ultra Pure™ Agarosa (Invitrogen™).
- Bromuro de Etidio (molecular SIGMA biology)
- Amplicones de especímenes (JW11-JW12)
- Amplicones de especímenes (HSP70 sen y antisen)
- Micropipetas (Thermo Scientific)
- Ladder 100 pb (Invitrogen)
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- Balanza analítica (ae ADAM AQT-600)
- Fotodocumentador (Biorad XR)
- Parafilm
- Fuente de Poder Fisher Scientific. Model: FB300.
- Microondas (Panasonic USP 4,942,516)

5.9. Secuenciamiento

- Productos de PCR JW11-JW12
- Productos de PCR HSP70 sen y antisen
- La secuenciación se realizó en Functional Biosciences en la ciudad de Madison en Estados Unidos.

5.10. Análisis de Secuencias

- Paquete estadístico Staden PRE GAP y GAP 4
- Software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7)
- Software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI
- Secuencias GenBank

6. MÉTODOS

6.1. Colección entomológica y separación de especímenes

Las colectas entomológicas fueron realizadas por Moises Gualapuro y Gabriela Vela. Todos los especímenes fueron conservados en Etanol al 70%. Se separaron los especímenes pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae basado en criterios morfológicos, para lo cual se utilizó un estéreo microscopio (LEICA EZ4). Los especímenes de interés se colocaron en tubos de tapa rosca de 2 ml con Etanol al 70%, en el borde del tubo se introdujo una pequeña torunda de algodón se tapó y fueron almacenados en el congelador a - 20°C.

6.2. Montaje en placa y secado de placas

Cada espécimen se colocó sobre un portaobjetos y para evitar la desecación se adicionó una o dos gotas de Etanol al 70%. Con ayuda de un estero microscopio (LEICA EZ4) y agujas estériles se cortó la cabeza, una de sus alas y los tres últimos segmentos del abdomen, las estructuras restante (tórax, abdomen, patas y ala) fueron transferidas a un tubo Eppendorf de 1.5ml y almacenado a -20°C, hasta ser utilizadas en el proceso de extracción de ADN. Posteriormente, a las estructuras que permanecieron en el portaobjetos se agregó dos gotas de solución Marc André y se esperó cerca de 20 segundos y con ayuda de una fosforera se calentó la placa con la

finalidad de aclarar las estructuras. Luego en otro portaobjetos se colocó una gota de goma cloral y se fueron transfiriendo las estructuras aclaradas una a una. La cabeza se colocó con los ojos hacia abajo (contra el portaobjetos), el ala paralela y los tres últimos segmentos con la parte ventral hacia el observador. Una vez ubicadas se colocó un cubre objetos redondo de 12mm de diámetro y se presionó ligeramente para asegurar que las estructuras no se muevan (Young & Duncan, 1994). Finalmente, se introdujo las placas en una Estufa (BIOBASE) para el proceso de secado, a 50°C durante tres días.

6.3. Identificación Taxonómica de Especímenes

Para identificar la especie se observó las placas con un microscopio (LEICA DME) en 40X y se prestó atención a las siguientes estructuras: cibario, palpos y espermoteca (Figura 3). Una vez observada las estructuras, para definir la especie se utilizaron las claves taxonómicas de Galati (2010) y Young (1994) basadas en caracteres morfológicos de la cabeza y genitalia.

6.4. Extracción de ADN

Se utilizó las estructuras previamente almacenadas a -20°C. Primero se lavó la muestra para lo cual se agregó 500 µl de PBS 1X, luego se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm y se eliminó el PBS. Posteriormente, se agregó 700 µl de CTAB, y con ayuda de un pistilo plástico estéril se trituró la muestra y se agregó 20 µl de Proteinasa K. Se homogenizó en un vórtex y se incubó por 2 horas a 65°C, agitando cada 15 minutos para facilitar la ruptura de las membranas celulares (Kieleczawa, 2006). Una vez terminada la incubación se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se agregó 700 µl de cloroformo: alcohol Isoamílico (24:1), se mezcló invirtiendo el tubo vigorosamente hasta formar una emulsión.

Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y se obtuvo dos fases, la inferior u orgánica y la superior o acuosa que contiene el ADN en suspensión y una interfase que contiene proteínas celulares. Se transfirió aproximadamente 500 µl del sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5ml nuevo rotulado, sin topar la interfase. Luego se agregó 1000 µl de etanol al 100% a -20°C se mezcló por inversión y se dejó toda la noche a -20°C sin movimiento (Kieleczawa, 2006).

Al día siguiente se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 13200 rpm, se descartó el sobrenadante cuidadosamente. Luego se lavó el pellet de ADN con 1000 µl de etanol al 70%, se invirtió varias veces para mezclar y se volvió a centrifugar por 10 minutos a 13200 rpm y se eliminó el sobrenadante. Una vez lavado el pellet se dejó secar el tubo Eppendorf sobre un papel absorbente y se esperó 15-20 minutos. Finalmente se resuspendió la muestra en 50 µl de buffer TE y se almacenó a -20°C (Kieleczawa, 2006).

6.5. Amplificación de una region conservada (120pb) de los minicírculos de ADNk de *Tripanosomatidae* mediante PCR en Tiempo Real

Para la amplificación de la región conservada de los minicírculos de Kinetoplasto se preparó un Mastermix que contenía: Evagreen, primers JW11: 5'-CCT ATT TTA CAC CAA CCC CCA GT -3' y primer JW12: 5'-GGG TAG GGG CGT TCT GCG AAA -3', agua de PCR y ADN (Tabla 3). La reacción final fue de 10µl, en este caso se utilizó 1µl de ADN de tres muestras iguales o diferentes, por lo tanto se añadió 3µl de ADN. Las condiciones del qPCR se muestran en la Tabla 4.

6.6. Amplificación de una region conservada (120pb) de los minicírculos de ADNk de *Tripanosomatidae* mediante PCR Convencional

Para la amplificación de la región conservada de los minicírculos del Kinetoplasto de 120 pb se preparó un Mastermix que contenía: Primers JW11 y JW12, ADN de las muestras que presentaron una Temperatura de Melting o Derretimiento 81°C (Figura 4). El volumen final de la reacción fue de 10µl y se utilizó 1µl de ADN (Tabla 5). Las condiciones de PCR utilizadas están descritas en la Tabla 6.

6.7. Amplificación de un fragment del gen de la Proteína del Shock Térmico HSP70 mediante PCR Convencional

Para la amplificación de un fragmento del gen de la proteína del shock térmico de 1422pb se preparó un Mastermix que contenía: Primers HSP70sen 5'-GACGGTGCCTGCCTACTTCAA-3', HSP70antisen 5'-CCGCCCATGCTCTGGT ACATC-3' y ADN de las muestras que amplificaron en 120pb. El volumen final de la reacción fue de 10 µl y se utilizó 2 µl de ADN (Tabla 7). Las condiciones de PCR utilizadas están descritas en la Tabla 8.

6.8. Electroforesis en gel de Agarosa

Para observar los resultados de la amplificación de los minicírculos del kinetoplasto y de la proteína del shock térmico se utilizó un gel de agarosa al 1.5%. El proceso, primero requirió de armar la cámara horizontal de electroforesis. Luego, se pesó 1,5g de agarosa y se colocó en un Erlenmeyer. Posteriormente, se adicionó 100 ml de buffer TBE 1X en el Erlenmeyer y se disolvió la mezcla en el microondas. Con la mezcla homogenizada se retira del microondas y se deja enfriar hasta que la solución tenga una temperatura tolerable. Después se agregó 1µl de bromuro de Etidio (0.01%), se mezcló suavemente y se vertió el contenido del Erlenmeyer sobre el molde de la cámara de electroforesis, se coloca el peine y se dejó solidificar

durante 20 minutos. A continuación se retira el peine, se coloca el gel en la cámara que tiene buffer TBE 1X hasta que el gel quede cubierto por completo. Se carga 4 µl de amplicón en el gel y se colocó un ladder de 100pb. Las condiciones de la electroforesis fueron: 85 Voltios, 200mA durante 45 minutos.

6.9. Secuenciamiento

Los amplicones obtenidos se enviaron a secuenciar al Functional Biosciences Inc. en la ciudad de Madison en Estados Unidos. Para la HSP70 se envió a secuenciar en sentido forward y reverse y para los minicírculos del Kinetoplasto sólo se envió en sentido reverse.

6.10. Análisis de secuencias

Los productos del secuenciamiento se limpiaron y analizaron por medio de los programas PreGap y GAP4 (Genome Assembly Program), la alineación fue realizada por los programas BioEdit Sequence Alignment y MEGA7.

Una vez obtenidas las secuencias, se alinearon y se realizó un árbol con el método del Neighbor Joining, se utilizó secuencias de referencia del GenBank de *Leishmania panamensis*, *Leishmania guyanensis* y *Leishmania braziliensis*.

7. RESULTADOS

7.1. Colectas entomológicas

De las colectas realizadas en los diferentes lugares de Esmeraldas, Manabí, Bolívar, Pichincha y Orellana se obtuvo un total de 1521 especímenes hembras pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae (Tabla 9). De las 1521 especímenes hembras colectadas se realizaron 540 montajes en placa y mediante el uso de claves morfológicas se identificaron las siguientes especies que son de interés

entomológico: *Psychodopygus panamensis*, *Nyssomyia trapii*, *Lutzomyia hartmanni*, *Lutzomyia gomezi*, *Psychodopygus carrerai carrerai*, *Psychodopygus carrerai thula*, *Nyssomyia richardwardi*, *Trichophoromyia reburra*, *Pintomyia serrana*, *Psychodopygus amazonensis*, *Lutzomyia tortura*, las mismas que se utilizaron en el análisis molecular (Tabla 10). De la misma forma, se identificaron especies que no tienen interés médico como: *Pressatyia disponeta*, y especies del género *Trichophoromyia*.

7.2. Amplificación de una region conservada (120pb) de los minicírculos de ADNk de *Tripanosomatidae* mediante PCR en Tiempo Real y Convencional

Se analizó un total de 324 muestras repartidas en 108 pools, cada pool tenía ADN de 3 especies (Tabla 10). Treinta pools fueron positivos, ya que presentaron una Curva de Melting o Derretimiento a 81°C (Tabla 11), (Figura 4). Todos los pools positivos; es decir 90 muestras fueron analizados mediante PCR convencional y se obtuvo 59 muestras que amplificaron en 120pb (Figura 5). Las muestras positivas provinieron de Manabí, Esmeraldas, Bolívar y Pichincha (Tabla 12).

7.3. Amplificación de un fragmento del gen de la Proteína del Shock Térmico HSP70

De las 59 muestras que amplificaron para ADNk, sólo 7 fueron positivas, ya que amplificaron con una banda de 1422pb del gen HSP70 (Figura 5). Estas muestras positivas provinieron de Manabí, Bolívar y Esmeraldas (Tabla 12).

7.4. Análisis de secuencias y Tasa de infección

De las 52 muestras que amplificaron en 120pb se enviaron a secuenciar 14 muestras sólo en sentido Reverse (JW12), las muestras fueron elegidas al azar, tomando en cuenta que sean especies diferentes; de diferentes provincias (Tabla 13). Por su

parte, de las 7 muestras que amplificaron en 1422pb se enviaron a secuenciar todas (Tabla 14). Se realizó el análisis molecular para JW11-JW12 y se determinó que 14 muestras estuvieron infectadas con el parásito *Endotrypanum*, por su parte; el análisis molecular para HSP70 mostró que los especímenes están infectados con ADN de *Leishmania guyanensis*. Las figuras 7 y 8 muestran los análisis moleculares.

Finalmente, de las 325 muestras procesadas, 59 muestras tuvieron la presencia de ADNk de *Tripanosomatidae* que representa el 18.15% del cual el 2.15% presentó ADN de *Leishmania guyanensis* y el 16% presentó ADN de *Endotrypanum*.

8. DISCUSIÓN

De las colectas entomológicas se obtuvo un total de 1521 especímenes hembras y 704 especímenes machos. Estudios en dípteros muestran que la presencia de un porcentaje mayor de hembras con respecto a los machos es correcta, ya que es un indicador ecológico que confirma la estabilidad de la eficacia biológica, como también se afirma que las diferentes poblaciones de insectos dependen del número de hembras existentes (Baum *et al.*, 2014; Valderrama *et al.*, 2011). En el presente estudio se identificó 11 especies de flebótomos que estuvieron distribuidos en las zonas tropicales y subtropicales de la Costa, Sierra y en la región Amazónica y que son especies ya reportados en estudios anteriores, las especies de flebótomos identificadas en esta investigación, coinciden con estudios realizados por Vela en 2013 y Palacios en 2014, debido a que se trabajó con muestras procedentes de los mismos sitio de muestreo realizados en 2013 y 2014. De estas especies, *Lutzomyia tortura*, *Nyssomyia richardwardi*, *Psychodopygus amazonensis*, *Psychodopygus carrerai carrerai* y *Psychodopygus geniculata* están presentes en la Amazonía (Azevedo *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2014; Kato *et al.*, 2013; Navarro *et al.*, 2005).

Además en países vecinos se ha reportado que la mayoría de flebótomos localizados en la región amazónica pertenecen al subgénero *Psychodopygus*, lo cual podría deberse a que estas especies se encuentran distribuidas en áreas boscosas y poco intervenidas por el ser humano (Cabrera *et al.*, 2009). Es importante señalar que todas las especies que se reportan en la Amazonía con excepción de *Psychodopygus geniculata* se identificaron en este estudio, además los reportes coinciden en que estas especies proceden de áreas boscosas poco intervenidas y en nuestro caso, las muestras procedieron únicamente de la Estación de Biodiversidad Tiputini, la cual es un área boscosa, poco intervenida y protegida.

Por su parte, *Lutzomyia hartmanni*, *Nyssomyia trapidoi*, *Psychodopygus panamensis*, *Psychodopygus carrerai thula* y *Pintomyia serrana* sólo se encontraron en las regiones tropicales y subtropicales de la Costa y Sierra ecuatoriana (Gómez *et al.*, 2014; Ovallos *et al.*, 2013). Esto podría deberse a la Cordillera de los Andes que atraviesa el país de Norte a Sur y genera diferentes pisos altitudinales y barreras geográficas (Burneo, 2011). Es importante mencionar que las especies identificadas en esta investigación fueron de Manabí, Esmeraldas, Bolívar y Pichincha, y no se identificó ninguna especie nueva o que no pertenezca a la Costa o Sierra ecuatoriana.

De igual forma, es evidente que la fragmentación de ambientes influye en la diversidad de flebótomos y permite que las especies desarrollen capacidades para adaptarse a nuevos microclimas (Valderrama *et al.* 2011). Otras especies como *Lutzomyia gomezi*, *Nyssomyia trapidoi*, *Psychodopygus panamensis*, ya no, sólo se las encuentra en los bosques, estas especies ahora se han adaptado a ambientes

antropogénicos como cultivos de café, plantaciones de cacao o ambientes con escasa vegetación; lo que les permitiría invadir casas y afectar a humanos (Nieves *et al.*, 2014).

Por su parte, de los 540 montajes en placa realizados, 325 muestras fueron consideradas como especies vectoras o posibles vectores. Las muestras que no fueron analizadas corresponden a *Pressatia dysponeta* y especies del género *Trychophoromyia* que hasta el momento no tienen interés médico.

Por otro lado, la tasa de infección con *Endotrypanum* encontrada en la presente investigación es del 16% la cual es relativamente alta y puede deberse a que se trabajó con muestras colectadas en diferentes localidades y en diferentes épocas del año, además hay que tomar en cuenta que existen reservorios de *Endotrypanum* como los perezosos de dos y tres dedos que portan el parásito sin que les genere ningún daño (Valderrama, et al., 2011). De la misma forma, en estudios realizados por Zapata, et al., 2012, reporta un 11.5% de infección por *Endotrypanum* en flebótomos de la especie *Nyssomyia trapidoi*. Así mismo, Vela (2014), obtiene una tasa de infección por *Endotrypanum* del 12,2% en *Nyssomyia trapidoi* colectados únicamente en la provincia de Bolívar, finalmente, Kato (2016), reporta una tasa del 3,9% de infección por *Endotrypanum* en flebótomos de la especie *Nyssomyia yuilli*. En sí, los estudios muestran diferentes tasas de infección, las mismas que van a variar de acuerdo a la cantidad de muestras que se analicen. De la misma manera, Calvopiña (2004), identificó y aisló parásitos del género *Endotrypanum* en perezosos del bosque tropical, de la zona del Pacífico y este bosque presenta condiciones ambientales similares a los sitios de recolección.

Por su parte, en la investigación, las especies infectadas con ADN de *Endotrypanum* fueron *Psychodopygus panamensis* (Bolívar y Pichincha), *Pintomyia serrana* (Manabí), *Ny. trapidoi* (Bolívar y Pichincha), *Ps. carrerai thula* (Bolívar) y *Lutzomyia gomezi* (Manabí); resultados que son interesantes, ya que en estudios realizados por Hashiguchi en 2017, encontraron promastigotes de *Endotrypanum* en *Nyssomyia trapidoi* y *Lutzomyia hartmanni*, esto amplía un poco más la información referente a las especies de flebótomos infectados por *Endotrypanu* en Ecuador. Cabe mencionar que los organismos del género *Endotrypanum* son los únicos del grupo Kinetoplastida que infectan los eritrocitos de algunos mamíferos (Ramos & Grimaldi, 1999). A diferencia de *Leishmania*, no se ha encontrado evidencia que *Endotrypanum* tenga la capacidad de evitar su destrucción por macrófagos como lo hace *Leishmania*, lo cual podría justificar su corto rango de hospedadores. Así mismo, se ha determinado que la supervivencia de *Leishmania* dentro de los macrófagos se debe a un lipofosfoglicano de la superficie de este parásito y otros factores de virulencia como metaloproteasas GP63, cisteína proteasa B, y fosfolípidos glicosilinositolícos (Olivier, et al., 2012). Esta diferencia en las moléculas de superficie, seguramente determina que *Endotrypanum* no cause infección en los humanos y esté restringido únicamente a los mamíferos del superorden Edentata (osos hormigueros, perezosos y armadillos) (Franco, et al., 2000).

Cabe mencionar, que la infección de flebótomos por *Endotrypanum* oscila entre 1 y 10% y actualmente sólo dos especies *E. schaudinni* y *E. monterogeii* han sido descritas y esto surge porque los parásitos tripanosomáticos son organismos muy complicados en su clasificación y estudios moleculares sugieren que varias especies de *Leishmania* están filogenéticamente más relacionados con *Endotrypanum* que con las otras especies de *Leishmania*, por lo que el género *Endotrypanum* en un

futuro puede subdividirse en varias especies o volver a clasificarse (Katakura, et al., 2003).

Por otro lado, se encontró 2.15% de flebótomos infectados con ADN de *Leishmania guyanensis*, estudios previos reportan a *L. guyanensis* y *L. braziliensis* como agentes causales de leishmaniasis cutánea tanto en la costa del Pacífico, en las zonas montañosas de los Andes y en áreas Amazónicas (Kato, et al., 2016). Sin embargo, en la Amazonía ecuatoriana no se dispone de mucha información sobre parásitos prevalentes y vectores de *Leishmania*; y en el presente estudio no se obtuvo información relevante que nos de indicios de encontrar un vector en la Amazonía. Lo reportado por Kato et al. (2016) tampoco es un nuevo hallazgo, ya que estudios realizados por Amunarriz et al., (1982), establecieron que hay leishmaniasis en la Amazonía pero se desconoce el vector.

Por su parte, la tasa de infección de ADN de *Leishmania* en flebótomos es baja, alrededor del 1%, sin embargo, la tasa de infección obtenida en este estudio es alta. Sin embargo, en México en el Estado de Campeche se analizaron 1288 muestras y se obtuvo 2.8% de infección con ADN de *Leishmania*, porcentaje que es alto y se asemeja a lo obtenido en este estudio, De igual forma, investigaciones realizadas en Chimborazo reportan una tasa de infección de 1.7% en un área cercana al Río Chanchán (Cantón Cumandá) y de 5.9% en el Cantón Alausí (Kato, et al., 2010), tasas de infección que son superiores al 1% que demuestran que existe una presencia alta de *Leishmania* en estas áreas. Por otra parte, estudios realizados por Santos da Silva y Grunewald (1999) en Brasil encontraron una infección del 0.3% luego de analizar 920 especímenes, porcentaje que es muy bajo. Esto nos hace

pensar que la tasa de infección con ADN de *Leishmania* va a depender del sitio de colecta, época del año y número de especímenes analizados.

Por otra parte, es importante señalar que en Ecuador, Colombia, Costa Rica y Panamá, *Nyssomyia trapidoi* es vector confirmado de *Leishmania guyanensis* pero en este estudio se encontró que *Psychodopygus carrerai thula* (Bolívar), *Lutzomyia gomezi* (Manabí), *Psychodopygus panamensis* (Esmeraldas y Bolívar) y *Pintomyia serrana* (Manabí), están infectadas con ADN de *Leishmania guyanensis*. En la investigación realizada por Delgado, 2016 en biopsias de leishmaniasis cutánea, colectadas en Pedro Vicente Maldonado (Pichincha), indican que el parásito que generó la enfermedad fue *Leishmania guyanensis*, lo que quiere decir que el parásito está ampliamente distribuido en Ecuador y este resultado concuerda porque *Leishmania guyanensis* es responsable de la Leishmaniasis cutánea, enfermedad que está distribuida en casi todo el Ecuador (Calvopiña, et al., 2004).

Un dato importante obtenido en este estudio es que *Psychodopygus carrerai thula* y *Pintomyia serrana* se encontraron infectados con ADN de *Leishmania guyanensis*, lo que a nuestro conocimiento corresponde un posible nuevo hallazgo, porque en Perú, *Pintomyia serrana* es vector confirmado de *Leishmania peruviana* y *Psychodopygus carrerai thula* es vector confirmado de *Leishmania panamensis* en Panamá (Dutari et al., 2014). A su vez, existen otras especies reportadas como vectores en países de la región: *Psychodopygus carrerai carrerai* de L. (V.) *braziliensis* y L. (L.) *amazonensis* en Bolivia, Brasil, Colombia, Perú y Venezuela (Grimaldi et al., 1989; Ryan et al., 1987); *Psychodopygus panamensis* de L. (V.) *panamensis* en Colombia y Venezuela (Kreutzer et al., 1991). Por lo tanto, el que

países vecinos reporten estas especies como vectores, se sospecharía que dichas especies presentan un comportamiento similar en Ecuador.

Estudios realizados en la frontera ecuatoriano-peruana demuestran que hay alta incidencia de *Pintomyia serrana*, pero únicamente en Perú es vector confirmado pero en Ecuador todavía no se reporta (Calvopiña, et al., 2004), (Davies *et al.*, 1993). En base a lo determinado en esta investigación, tanto a *Psychodopygus carrerai thula* y *Pintomyia serrana* se les establece como posibles vectores, pero es importante señalar la diferencia entre un vector confirmado y un posible vector. Un vector presenta las siguientes características: debe ser antropofílico, zoofílico, el insecto se encuentra infectado naturalmente con la misma especie de *Leishmania* encontrada en el hombre y el insecto debe favorecer el crecimiento de la *Leishmania*, permitiendo su desarrollo hasta llegar a ser infectiva y transmitirlo a otro vertebrado mediante una picadura (Cáceres, 1995). Por su parte, un posible vector debe tener las siguientes características: ser un vector confirmado en otros países, debe ser antropofílico y zoofílico y que por evidencia epidemiológica, las localidades donde está presente son endémicas de leishmaniasis (Cáceres, 1995).

Finalmente, la investigación no reporta infección de *Leishmania*, ni *Endotrypanum* en la Amazonía. Sin embargo, estudios realizados por Kato et al., (2016), determinaron dos casos de Leishmaniasis cutánea causado por *L. (V) lainsoni*, en Sucumbios y Orellana, ahora para determinar el vector se realizaron colecciones entomológicas donde los pacientes presumiblemente contrajeron la enfermedad pero ninguna de las moscas dieron positivas para este parásito, aunque, si existen infecciones naturales con *Leishmania (V) lainsoni*, en *Lutzomyia ubiquitalis* en

Brasil, *Lutzomyia nuneztovari anglesi* en Bolivia, *Lutzomyia auraensis* en Perú y en Ecuador no se conoce el vector de *Leishmania (V) lainsoni*, pero se muestra que *Lutzomyia tortura* es vector de *Leishmania (V) naiffi* en la Amazonía ecuatoriana (Hashiguchi, 2017).

9. CONCLUSIONES

- Se encontró el 2.2% de infección por ADN de *Leishmania guyanensis* y un 16% de infección con ADN de *Endotrypanum* en flebótomos provenientes de Esmeraldas, Manabí, Pichincha y Bolívar.
- Las especies infectadas con ADN de *Leishmania guyanensis* fueron *Psychodopygus panamensis*, *Lutzomyia gomezi*, *Psychodopygus carrerai thula* y *Pintomyia serrana* provenientes de Esmeraldas, Manabí y Bolívar.
- Las especies que tuvieron presencia de ADN de *Endotrypanum* fueron *Lutzomyia hartmanni*, *Lutzomyia gomezi*, *Nyssomyia trapedoi*, *Psychodopygus panamensis*, *Psychodopygus carrerai thula* y *Pintomyia serrana*.
- No se encontraron coinfecciones de *Leishmania* y *Endotrypanum* por lo que se asume que probablemente existe inhibición del desarrollo de uno de los dos parásitos en el vector.

10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar colectas en diferentes zonas geográficas y épocas del año para lograr capturar una mayor cantidad y diversidad de especímenes con la finalidad de poder actualizar la lista de vectores de *Leishmania* en Ecuador.
- Se recomienda realizar colectas entomológicas en diferentes áreas de las provincias de Bolívar y Manabí, ya que en estos lugares se obtuvo las muestras de las especies *Psychodopygus carrerai thula* y *Pintomyia serrana* que en esta investigación se los reporta como posibles vectores, con el propósito de confirmar nuestro hallazgo.
- Realizar estudios para conocer la tasa de infección y así poder predecir si habrán o no casos de leishmaniasis en las áreas donde se realizan las colectas entomológicas.
- Se recomienda utilizar herramientas moleculares como el PCR en Tiempo Real para determinar la presencia de ADN del Kinetoplasto de *Tripanosomatidae*, debido a que es una herramienta muy sensible y trabaja con concentraciones de ADN muy bajas.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Alvar, J. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLOS*.
- Amunarriz, M. (1982). Leishmaniasis: Salud y enfermedad, patología tropical en la región amazónica Napo. *Centro de Investigaciones Culturales de la Amazonia Ecuatoriana*, pp. 73-88.
- Anuario de Vigilancia Epidemiológica del Ecuador. (2016). *Enfermedades de la piel*. Recuperado el 23 de junio 2016 desde <http://www.msp.gov.ec/images/leishmania.pdf>
- Ashford, R. (1997). What it takes to be a reservoir host. *Belg. J. Zool.* pp. 85-90.
- Azevedo, A., Costa, S., Pinto, M., Souza, J., Cruz, H., Vidal, J., y otros. (2008). Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, pp. 760-767.
- Azpura, J., De la Cruz, D. & Valderama, A. y. W. D. (2010). Lutzomyia sand fly diversity and rates of infection by wolbaachia anda an exotic Leishmania species on Barro Colorado Island, Panama. *PLOS*, Volumen 4.
- Bass, M., Finer, M., Jenkins, C. (2010). Global Conservation Significance of Ecuador's Yasuní National Park. *PloS ONE*.
- Bañuls, A. y otros. (1999). Genetic analysis of Leishmania parasites in Ecuador are Leishmania panamensis and Leishmania guyanensis distinct taxa. *American society of tropical medicine and hygiene*, Volumen 61, pp. 838-845.
- Burneo, S. (2011). *Flacso*. Recuperado de Megadiversidad el 23 de enero 2017 desde https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CCsQFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.flacsoandes.edu.ec%2Fweb%2FimagesFTP%2F1240522090.2._Megadiversidad__Santiago_Burneo.doc&ei=YK3vVOWhNomcgwSK84H4Bw&usg=AFQjCNG5yNireDWGD1SSyF1It1AeSirQfw&sig2=El3yHKl5tB9VE1PiOqj25w&bvm=bv.86956481,d.eXY&cad=rja.
- Cabrera, O., Mosquera, L., Santamaría, E., & Ferro, C. (2009). Flebótomos (Diptera: Psychodidae) del departamento de Guaviare, Colombia, con nuevos registros para el país. *Biomédica*.
- Cáceres, A. (1995). Especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) vectores de la "Uta" en el Perú. *Instituto Nacional de Salud del Perú*, 38, pp. 23-26.

- Calvopiña, M., Armijos, R. & Hashiguchi, Y., (2004). Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador. Current status of knowledge. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99, pp. 663-672.
- Cárdenas, A., Óscar, V., Romero, D., Salamanca, E., Santalla, A y otros. (2012). Analysis of molecular markers for typing of *Leishmaniaspp.* parasites circulating in La Paz department, Bolivia. *BIOFARVO*, 20, pp. 2-10.
- Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M (2014). Detection and Characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR Green-Based Real-Time PCR and High Resolution Melt Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA. *PLOS ONE*. 9(2): e88845.
- Contreras, M., 2013. *Lutzomyia* spp en zonas cafeteras de la región andina colombiana: taxonomía e importancia médica. *Universidad Nacional de Colombia*.
- Davies, C. y otros, (2000). The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad. Saúde Pública*, 16, pp. 925-950.
- Delgado, J. (2016). Detección y caracterización molecular de *Leishmania* en lesiones cutáneas de pobladores del Cantón Pedro Vicente Maldonado. *Universidad San Francisco de Quito*.
- Desjeux, P. (2001). El aumento de los factores de riesgo de leishmaniasis en todo el mundo. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 95, pp. 239-243.
- Dujardin, J., Le Pont, F.(2000). Morphometrics of a neotropical sandfly species, *Lutzomyia carrerae* thula. . *Comptes Rendus de l'Academie des sciences Series III*, 273-279.
- Dutari, L., & Loaiza, J. (2014). American Cutaneous Leishmaniasis in Panama: a historical review of entomological studies on anthropophilic *Lutzomyia* sand fly species. *Parasites & Vectors*.
- Feitosa, M. & Castellón, E., 2006. Fauna de flebotomíneos em fragmentos de floresta ao redor de conjunto habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. *Estratificacao Vertical. Acta Amazonica*, 36(4), pp. 539-548.
- Franco, A., Machado, G., Moreira, C. & Grimaldi, G. (2000). Minicircle kDNA microheterogeneity in *Endotrypanum* indicate diversity within this Genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95(2), pp. 189-191.
- Franco, A., Hill, J., Kitchke, C., Collingham, Y., Roy, D., Fox, R., y otros. (2006). Impacts of climate warming and habitat loss on extinction at species' low-latitude range boundaries. *Global Change Biology*, 1545-1553.

- Galati, E. (2010). Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) Classificação, Morfologia, Terminologia e Identificação de Adultos. Apostila Disciplina HEP 5752 Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. Vol. I. *Departamento de Epidemiologia Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo* Av. Dr. Arnaldo, 715, 01246-904, São Paulo, SP, Brasil.
- Gómez, E., Kato, H., & Hashiguchi, Y. (2014). Man-biting sand fly species and natural infection with the *Leishmania* promastigote in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador. *Acta Tropica*, 41-49.
- Grimaldi, G. J., & McMahon-Pratt, D. (1989). A review of the geographic distribution epidemiology of leishmaniasis in the New World. *J. Trop. Med. Hyg.*
- Grimaldi, G. J. (1992). Description of *Leishmania equatorensis* sp. in (Kinetoplastida: trypanosomatidae), a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 221-228.
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurter, D. y Buchner, J. (2005). Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol* 12, 842-846.
- Hashiguchi, Y., Gomez, E., De Coronel, V., Mimori, T., & Kawabata, M. (1985). *Leishmania* Isolated from Wild Mammals Caught in Endemic Areas of Leishmaniasis in Ecuador. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 120-121.
- Hashiguchi, Y., Velez, L., Villegas, N., Tatsuyuki, M., Gomez, E., & Hirotomo, K. (2017). Leishmaniasis in Ecuador: Comprehensive review and current status. *Acta tropica* (166), 299-315.
- Hashiguchi, Y., Gomez, L. (1991). A review of leishmaniasis in Ecuador. *PUBMED*, 25(1), PP. 64-76.
- Haydon, D. C. (2002). Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis*, 1468-1473.
- Heinert, J. F. (1991). Un caso de leishmaniasis cutáneomucosa. *An Soc Med Quir Guayas*, 3450-451.
- Jansen, A., Roque, A. (2010). Domestic and Wild Mammalian Reservoirs. *Elsevier, London*, 249-276.
- Jones, L., Cohnstaedt, L., Beati, L., Terán, R., León, R., & Munstermann, L. (2010). New Records of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) From Ecuador. *National Institute of Health*.
- Katakura, K. y otros. (2003). Identification of Endotrypanum species from sloth, a squirrel and lutzomyia sandflies in Ecuador by PCR amplification and sequencing of the mini exon gene. *J. Vet. Med. Sci*, 65(5), pp. 649-653.

- Kato, H. y otros. (2010). Molecular Epidemiology for vectors research on Leishmaniasis. *International Journal of environmental research a public health*, Volumen 7, pp. 814-826.
- Kato, H., Calvopiña, M., Criollo, H., & Hashiguchi, Y. (2013). First human cases of *Leishmania (Viannia) naiffi* infection in Ecuador and identification of its suspected vector species. *Acta Tropica*
- KATO, H. Y OTROS. (2016). FIRST HUMAN CASES OF *LEISHMANIA (VIANNIA) LAINSONI* INFECTION AND A SEARCH FOR THE VECTOR SAND FLIES IN ECUADOR. *PLOS ONE*. PP. 2-8
- Kato H., Gomez EA., Martini-Robles L., Muzzio J., Velez L., Calvopiña M, et al. (2016). Geographic Distribution of *Leishmania* Species in Ecuador Based on the Cytochrome B Gene Sequence Analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, Volumen 65, pp. 2-8.
- Kieleczawa, J. *DNA Sequencing II Optimizing Preparation and Cleanup*. Ontario: Jones and Bartlett Publishers.
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and veterinary entomology*, Volumen 4, pp. 1-24.
- Kreutzer R.D., Corredor A., Grimaldi G., Jr., Grogl M., Rowton E.D., Young D.G. (1991). Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. (Kinetoplastida: trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg* , 662-675.
- Lainson, R. & Shaw, J. (1978). Epidemiology and ecology of leishmaniasis in latin america. *Macmillan Journals LTD*, 273(5664), pp. 595-600.
- Lawrence, F., Robert-Gero, M. (1985). Induction of heat shock and stress proteins in promastigotes of three *Leishmania* species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, pp. 4414-4417.
- Mayer, M. P. y Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 62, pp. 670-684.
- Miller, E. Hupper, A. (2013). The effects of host diversity on vector-borne disease: the conditions under which diversity will amplify or dilute the disease risk. *PLoS ONE*.

- Montalvo, A., Fraga, J., Monzote, L., García, M., y Fonseca, L. (2012). Leishmaniasis diagnosis: going from microscopic observation of parasite to DNA detection. *Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"*.
- Navarro, F., Castellanos, H., & Vélez, I. (2005). Phlebotomine fauna in the Imataca Forest Reserve, State of Bolívar, and report of new species for Venezuela. *Revista COPÉRNICO* 2005, pp. 264-268.
- Nieves, E. O., Rondón, Y., Sánchez, M., Sánchez, Y., Rojas, M., Rondón, M., y otros. (2014). Effect of Environmental Disturbance on the Population of Sandflies and Leishmania Transmission in an Endemic Area of Venezuela. *Journal of Tropical Medicine*.
- Nicolas, L., Prina, E., Milon, G. & Lang, T., 2002. Real-Time PCR for detection and quantitation of Leishmania in Mouse Tissues. *Journal of clinical microbiology*, 40(5), pp. 1666-1669.
- Olivier, M., et al. (2012). *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes and infection*, Volumen 14, pp. 1377-1389.
- Ovallos, F., Espinosa, Y., Fernandez, N., Gutierrez, R., Bianchi, E., & Sandoval, C. (2013). The sandfly fauna, anthropophily and the seasonal activities of *Pintomyia spinicrassa* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in northeastern Colombia. *MEM INST OSWALDO CRUZ*.
- Palacios, E. (2015). Identificación Molecular de las Preferencias Tróficas de flebótomos colectados en 5 provincias ecuatorianas. *Universidad san Francisco de Quito*.
- Ramos, A. & Grimaldi, G. (1999). Characterization of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a unique parasite infecting the neotropical tree Sloths. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94(2), pp. 261-268.
- Restrepo, C. y otros. (2011). Amplified Fragment Length Polymorphisms reveals high intraespecific variability in field isolates of *Leishmania panamensis*. *Current trends in Biotechnology and Pharmacy*, Volumen 5, pp. 1183-1192.
- Rodríguez, C., & Castillo, M. (2005). Analisis De Los Sistemas De Produccion En El Territorio De Seis Comunidades Kichwas Asentadas En La Zona Noroccidental Del Parque Nacional Yasuní, Rio Napo Orellana - Ecuador. *Biodiversity & Sustainable Forestry (BIOFOR) IQC*.

- Ryan, L., Lainson, R., Shaw, J., Braga, R., & Ishikawa, E. (1987). Leishmaniasis in Brazil. XXV. Sandfly vectors of *Leishmania* in Pará State, Brazil. . *Medical and Veterinary Entomology*
- Santos da Silva, O. & Grunewald, J. (1999). Contribution to the Sand Fly Fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Volumen 94(5) pp. 579-582.
- Silveira, X. (1998). Glycoinositol phospholipids from *Endotrypanum* species express epitopes in common with saccharide side chains of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *Biochemistry journal*, Volumen 329, pp. 665-673.
- Takaoka, H., Gómez, E., Alexander, J. & Hashiguchi, Y. (1990). Further studies on the natural infections of Ecuadorian sandflies (Diptera, Psychodidae) with *Leishmania* promastigotes. *Journal of medical entomology*, Volumen 27, pp. 701-702.
- Valderrama, A., M., H. & Salazar, A. (2008). Relación entre la composición de especies del género de *Lutzomyia* franca y los diferentes tipos de bosque en Panamá. *Acta zoológica mexicana*, 24(2), pp. 67-78.
- Valderrama, A., Tavares, M. & Dilermando, J., 2011. Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae) vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(8), pp. 1024-1031.
- Vasquez, A. (2011). *Variación estacional de la abundancia y la infección con Leishmania spp. en flebótomos de un área rural de Villavicencio*. Universidad Nacional de Colombia.
- Veijalainen, A., Wahlberg, N., Broad, G., Erwin, T., Longino, J., & Sääksjärvi, I. (2012). Unprecedented ichneumonid parasitoid wasp diversity in tropical forests. *Proc. R. Soc. B*, 4694-4698.
- Woolhouse, M., Dye C., Etard, F., Smith T., Charlwood J.D. (1997). Heterogeneities in the transmission of infectious agents: implications for. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 338-342.
- Young, D., & Duncan, M. (1994). Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sand Flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae) *Associated-Publishers-American Entomological Institute*.

- Zapata, S. y otros. (2012). Morphometric and molecular characterization of the series Guyanensis (Diptera, Psychodidae, Psychodopygus) from the ecuadorian Amazon basin with the description of a new sppecies. *Infection, genetics and evolution*, Volumen 12, pp. 966-977.
- Zapata, S. y otros. (2012). A study of a population of Nyssomyia trapidoi (Diptera: Psychodidae) caught on the Pacific coast of Ecuador. *Parasites and Vectors*, Volumen 144.
- Zilberstein, D., Shapira, M. (1994). The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 48, pp.449-470

12. TABLAS

Tabla 1. Especies de *Leishmania* causantes de Leishmaniasis cutánea y mucocutánea en Ecuador (Kato, et al., 2016).

Especie de <i>Leishmania</i>	Región del Ecuador donde se encuentra <i>Leishmania</i>	Tipo de leishmaniasis que produce
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Costa	Cutánea
<i>L. (V.) panamensis</i>		
<i>L. (V.) braziliensis</i>		
<i>L. (L.) amazonensis</i>		
<i>L. (L.) mexicana</i>	Sierra	Cutánea
<i>L. (L.) major</i>		
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Amazonía	Cutánea Mucocutánea
<i>L. (V.) braziliensis</i>		
<i>L. (V.) naiffi</i>		
<i>L. (V.) lainsoni</i>		

Tabla 2. Reservorios de *Leishmania* en América (Roque & Jansen, 2014).

Orden	Reservorio	Especie de <i>Leishmania</i>	País
Didelphimorphia	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>L. infantum</i>	Brasil
	<i>D. aurita</i>	<i>L. infantum</i>	Brasil
	<i>Marmosa sp</i>	<i>L. (Viannia) sp.</i>	Brasil
	<i>Gracilinanus agilis</i>	<i>L. braziliensis</i>	Brasil
	<i>Monodelphis domestica</i>	<i>L. (Viannia) sp.</i>	Brasil
	<i>Marmosa cinérea</i>	<i>L. amazonensis</i>	Brasil
Pilosa	<i>Choloepus didactylus</i>	<i>L. guyanensis L. shawi</i>	Guyana francesa, Brasil
	<i>Choloepus hoffmanni</i>	<i>L. colombiensis L. equatoriensis L. panamensis</i>	Ecuador Panamá
	<i>Bradypus tridactylus</i>	<i>L. shawi</i>	Brasil
Rodentia	<i>Proechimys species</i>	<i>L. amazonensis, L. guyanensis</i>	Guyana francesa, Brasil
	<i>Oryzomys melanotis</i>	<i>L. amazonensis</i>	México
	<i>Nectomys squamipes</i>	<i>L. infantum, L. braziliensis</i>	Brasil
	<i>Coendu prehensilis</i>	<i>L. infantum</i>	Bolivia
	<i>Sigmodon hispidus</i>	<i>L. braziliensis, L. mexicana</i>	Venezuela
	<i>Rattus rattus</i>	<i>L. infantum, L. braziliensis, L. mexicana</i>	Brasil, Venezuela
	<i>Phyllotis andinum</i>	<i>L. peruviana</i>	Perú
	<i>Peromyscus yucatanicus</i>	<i>L. mexicana</i>	México
	<i>Sciurus vulgaris</i>	<i>L. amazonensis</i>	Ecuador
	<i>Sciurus granatensis</i>	<i>L. equatorensis</i>	Ecuador
	<i>Nyctomys sumichrasti</i>	<i>L. mexicana</i>	Honduras
Carnivora	<i>Cerdocyon thous</i>	<i>L. infantum, L. amazonensis</i>	Brasil
	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	<i>L. infantum</i>	Brasil
	<i>Potos flavus</i>	<i>L. guyanensis, L. amazonensis</i>	Guyana francesa, Ecuador
	<i>Puma concolor</i>	<i>L. infantum</i>	Brasil
Primata	<i>Cebus apella</i>	<i>L. shawi</i>	Brasil
	<i>Cebus xanthosternos</i>	<i>L. infantum</i>	Brasil
	<i>Aotus azarai</i>	<i>L. (Viannia) spp</i>	Argentina
	<i>Callicebus nigrifrons</i>	<i>L. infantum</i>	Brasil

Continuación Tabla 2. Reservorios de *Leishmania* en América (Roque & Jansen, 2014).

Orden	Reservorio	Especie de <i>Leishmania</i>	País
Chiroptera	<i>Carollia perspicillata</i>	<i>L. infantum</i>	Venezuela
	<i>Molossus molossus</i>	<i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. (V.) spp</i>	Brasil
	<i>Eumops glaucinus</i>	<i>L. amazonensis</i>	Brasil
	<i>Artibeus literatus</i>	<i>L. amazonensis</i>	Brasil
	<i>Myotis nigricans</i>	<i>L. amazonensis</i>	Brasil

Tabla 3. Reacción de PCR para la amplificación de una región de los minicírculos del Kinetoplasto de *Tripanosomatidae* mediante PCR en Tiempo Real.

Reactivos	Concentración inicial stock (C1)	Concentración final (C2)	Volumen para una reacción (V1)
Evagreen Supermix BioRad™	-	-	5.00 µl
Primer JW11	50Mm	0.75mM	0.15 µl
Primer JW12	50mM	0.75mM	0.15 µl
H2O	-	-	1.70 µl
ADN	-	-	3.00 µl*
Volumen total			10.00 µl

* Se colocará 1ul de ADN de tres muestras diferentes o iguales hasta llegar al volumen final de 3ul de ADN.

Tabla 4. Condiciones de PCR en Tiempo Real (qPCR) para la amplificación de una región de los minicírculos del kinetoplasto de *Tripanosomatidae*.

Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Slope (s)
Denaturación	95	8	20
Amplificación (40 ciclos)	95	10	20
	56	10	20
	72	8	20
Melting (Derretimiento)	95	10	20
	67	30	20
	95	10	0.1
Cooling	40	60	20

* Tiempo de reacción = 1:38 horas

Tabla 5. Reacción de PCR para la amplificación de una región de los minicírculos del Kinetoplasto de *Tripanosomatidae* mediante PCR Convencional.

Reactivos	Concentración inicial stock (C1)	Concentración final (C2)	Volumen para una reacción (V1)
Buffer	5X	1X	2.00 ul
dNTPs	2mM	0.4mM	2.00 ul
MgCl ₂	25mM	2.5mM	1.00 ul
Primer JW11	50mM	0.75uM	0.15 ul
Primer JW12	50mM	0.75uM	0.15 ul
Taq Polimerasa	5U/ul	0.5uM	0.10 ul
H ₂ O	-	-	3.60 ul
ADN	-	-	1.00 ul
Volumen total			10.00 ul

Tabla 6. Condiciones de PCR Convencional para la amplificación de una región de los minicírculos del kinetoplasto de *Trypanosomatidae*.

Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94	3 minutos	1
Denaturación cíclica	94	1 minuto	30
Primer Annealing	59	30 segundos	
Extensión	72	30 segundos	
Extensión final	95	10 minutos	1

* Tiempo de reacción = 1:38 horas

Tabla 7. Reacción de PCR para la amplificación de un fragmento del gen de la proteína del shock térmico HSP70 mediante PCR Convencional.

Reactivos	Concentración inicial stock (C1)	Concentración final (C2)	Volumen para una reacción (V1)
Buffer	5X	1X	2.00 ul
dNTPs	2Mm	0.1mM	1.00 ul
MgCl ₂	25mM	1.75mM	0.70 ul
Primer JW11	10mM	0.40mM	0.40 ul
Primer JW12	10mM	0.40mM	0.40 ul
Taq Polimerasa	5U/ul	0.025uM	0.05 ul
H ₂ O	-	-	3.45 ul
ADN	-	-	2.00 ul
Volumen total			10.00 ul

Tabla 8. Condiciones de PCR Convencional para la amplificación de un fragmento del gen de la proteína del shock térmico HSP70.

Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	95	15 minutos	1
Denaturación cíclica	94	30 segundos	45
Primer Annealing	60	1 minuto	
Extensión	72	1 minuto	
Extensión final	72	6 minutos	1

* Tiempo de reacción = 2:52 horas

Tabla 9. Resumen de los especímenes hembras colectados en cinco provincias del Ecuador.

Provincia	Lugar y Fecha de Colección	Nº de Especímenes Hembras	Nº de Montajes en Placa realizados
Esmeraldas	Santo Domingo de Onzole Febrero 2013 La Tablada Marzo 2013	79	79
Manabí	Murucumba Agua Sucia La Mina Marzo 2013	88	88
Bolívar	La Alsacia El Congreso Marzo 2013	143	143
Orellana	Estación de Biodiversidad Tiputini USFQ Octubre-Noviembre 2013	426	101
Pichincha	Paraíso Escondido Noviembre 2013	785	129
	Total de especímenes colectados	1521	540

*Total de especímenes machos colectados = 704

Tabla 10. Número de especímenes utilizados para el análisis molecular por Provincia.

	Provincias					
Especie	Esmeraldas	Manabí	Bolívar	Orellana	Pichincha	Total
<i>Psychodopygus panamensis</i>	27	18	24		34	103
<i>Nyssomyia trapidoi</i>			26		28	54
<i>Pressatia* dysponeta</i>	35	26	23		44	128
<i>Lutzomyia hartmanni</i>	7	14	21			42
<i>Trichophoromyia*</i>				70		70
<i>Lutzomyia gomezi</i>	6	24	21			51
<i>Psychodopygus carrerai carrerai</i>				15		15
<i>Psychodopygus carrerai thula</i>			27			27
<i>Nyssomyia richardwardi</i>				14		14
<i>Trichophoromyia* reburra</i>	1	1	1		23	26
<i>Pintomyia serrana</i>	2	5				7
<i>Psychodopygus amazonensis</i>				2		2
<i>Lutzomyia tortura</i>	1					1
Total de especímenes utilizados	79	88	143	101	129	540

* *Pressatia dysponeta* y *Trichophoromyia* no se procesan porque no son de interés.

* De las 26 muestras de *Trichophoromyia reburra*, sólo se procesó 6 muestras

* **Total muestras procesadas = 325**

Tabla 11. Número de Pools procesados en PCR en Tiempo Real

Especie de flebótomo	Nº de Pools	Nº de Pools Positivos
<i>Lutzomyia gomezi</i>	17	4
<i>Lutzomyia hartmani</i>	14	7
<i>Nyssomyia trapidoi</i>	18	3
<i>Pi ntomyia serrana</i>	3	2
<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	9	5
<i>Psychodopygus panamensis</i>	35	9
<i>Nyssomyia richardwardi</i>	5	0
<i>Trichoporomyia reburra</i>	2	0
<i>Psychodopygus amazonensis/ Lutzomyia tortura</i>	1	0
<i>Psychodopygus carrerai carrerai</i>	5	0
Total	109	30

Tabla 12. Lista de especies positivas para ADNk y HSP70 por provincia

Código	Especie vector/posible vector	Provincia	Positivo para JW11-JW12	Positivo para HSP70
3M23	<i>Lutzomyia gomezi</i>	Manabí	SI	SI
1M22	<i>Lutzomyia gomezi</i>	Manabí	SI	NO
5M21	<i>Lutzomyia gomezi</i>	Manabí	SI	NO
5M55	<i>Lutzomyia gomezi</i>	Manabí	SI	NO
7M21	<i>Lutzomyia gomezi</i>	Manabí	SI	NO
LT79	<i>Lutzomyia gomezi</i>	Esmeraldas	SI	NO
B12F4	<i>Lutzomyia hartmani</i>	Bolívar	SI	NO
B16A38	<i>Lutzomyia hartmani</i>	Bolívar	SI	NO
B14A10	<i>Lutzomyia hartmani</i>	Bolívar	SI	NO
B16A35	<i>Lutzomyia hartmani</i>	Bolívar	SI	NO
B6E3	<i>Lutzomyia hartmani</i>	Bolívar	SI	NO
B8C2	<i>Lutzomyia hartmani</i>	Bolívar	SI	NO
LT65	<i>Lutzomyia hartmani</i>	Esmeraldas	SI	NO
LT213	<i>Lutzomyia hartmani</i>	Esmeraldas	SI	NO
LT714	<i>Lutzomyia hartmani</i>	Esmeraldas	SI	NO
LT717	<i>Lutzomyia hartmani</i>	Esmeraldas	SI	NO
8M45	<i>Lutzomyia hartmani</i>	Manabí	SI	NO
IM67	<i>Lutzomyia hartmani</i>	Manabí	SI	NO
5M27	<i>Lutzomyia hartmani</i>	Manabí	SI	NO
7M34	<i>Lutzomyia hartmani</i>	Manabí	SI	NO
254	<i>Nyssomyia trapidoi</i>	Bolívar	SI	NO
268	<i>Nyssomyia trapidoi</i>	Bolívar	SI	NO
269	<i>Nyssomyia trapidoi</i>	Bolívar	SI	NO
271	<i>Nyssomyia trapidoi</i>	Bolívar	SI	NO
B12F8	<i>Nyssomyia trapidoi</i>	Bolívar	SI	NO
182	<i>Nyssomyia trapidoi</i>	Pichincha	SI	NO
5M28	<i>Pintomyia serrana</i>	Manabí	SI	SI
5.11	<i>Pintomyia serrana</i>	Esmeraldas	SI	NO
8M14	<i>Pintomyia serrana</i>	Manabí	SI	NO
3M26	<i>Pintomyia serrana</i>	Manabí	SI	NO
B16A29	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	Bolívar	SI	SI
B16A22	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	Bolívar	SI	NO
B14A19	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	Bolívar	SI	NO
B14A11	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	Bolívar	SI	NO
B15B26	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	Bolívar	SI	NO

Continuación Tabla 12. Lista de especies positivas para ADNk y HSP70 por provincia.

Código	Especie vector/posible vector	Provincia	Positivo para JW11-JW12	Positivo para HSP70
B16A30	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	Bolívar	SI	NO
B14A20	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	Bolívar	SI	NO
B16A27	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	Bolívar	SI	NO
B16A23	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	Bolívar	SI	NO
B16A24	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	Bolívar	SI	NO
IM31	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	Manabí	SI	NO
289	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Bolívar	SI	SI
5.1	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Esmeraldas	SI	SI
LTC2	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Esmeraldas	SI	SI
B6E13	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Bolívar	SI	NO
B4F3	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Bolívar	SI	NO
5.13	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Esmeraldas	SI	NO
7.7	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Esmeraldas	SI	NO
5.2	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Esmeraldas	SI	NO
LT113	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Esmeraldas	SI	NO
3.2 (3A)	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Esmeraldas	SI	NO
169	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Manabí	SI	NO
4M55	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Manabí	SI	NO
247	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Pichincha	SI	NO
216	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Pichincha	SI	NO
242	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Pichincha	SI	NO
213	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Pichincha	SI	NO
250	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Pichincha	SI	NO
252	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Pichincha	SI	NO

Tabla 13. Lista de especies infectadas con ADN de *Endotrypanum*.

Código de la muestra	Especie del vector o posible vector	Provincia/localidad de recolección	Especie que infecta al vector
268	<i>Nyssomyia trapidoi</i>	Bolívar /Echeandía	<i>Endotrypanum</i>
B14A19	<i>Psychodopygus Carrerai thula</i>	Bolívar/Echeandía	<i>Endotrypanum</i>
B16A27	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	Bolívar/Echeandía	<i>Endotrypanum</i>
B14A11	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	Bolívar/Echeandía	<i>Endotrypanum</i>
B14A20	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	Bolívar/Echeandía	<i>Endotrypanum</i>
B4F3	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Bolívar/Echeandía	<i>Endotrypanum</i>
LT68	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Esmeraldas/La Tablada	<i>Endotrypanum</i>
1M22	<i>Lutzomyia gomezi</i>	Manabí /Pedernales	<i>Endotrypanum</i>
8M14	<i>Pintomyia serrana</i>	Manabí /Pedernales	<i>Endotrypanum</i>
IM67	<i>Lutzomyia hartmanni</i>	Manabí/ El Carmen	<i>Endotrypanum</i>
297	<i>Psychodopygus carrerai carrerai</i>	Orellana/Tiputini	<i>Endotrypanum</i>
182	<i>Nyssomyia trapidoi</i>	Pichincha/Paraíso Escondido	<i>Endotrypanum</i>
213	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Pichincha/Paraíso Escondido	<i>Endotrypanum</i>
5M55	<i>Lutzomyia gomezi</i>	Manabí/ El Carmen	<i>Endotrypanum</i>

Tabla 14. Lista de especies infectadas con ADN de *Leishmania*

Código de la muestra	Especie	Provincia de recolección/localidad	Especie de parásito que infecta al vector
5.1	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Esmeraldas, Sto. Domingo de Onzole	<i>Leishmania guyanensis</i>
B16A29	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	Bolívar, El Congreso	<i>Leishmania guyanensis</i>
LTC2	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Esmeraldas, La Tablada	<i>Leishmania guyanensis</i>
5M28	<i>Pintomyia serrana</i>	Manabí, La Mina	<i>Leishmania guyanensis</i>
289	<i>Psychodopygus panamensis</i>	Bolívar, El Congreso	<i>Leishmania guyanensis</i>
3M23	<i>Lutzomyia gomezi</i>	Manabí, La Mina	<i>Leishmania guyanensis</i>
LT65	<i>Lutzomyia hartmani</i>	Esmeraldas	<i>Leishmania guyanensis</i>

13. FIGURAS

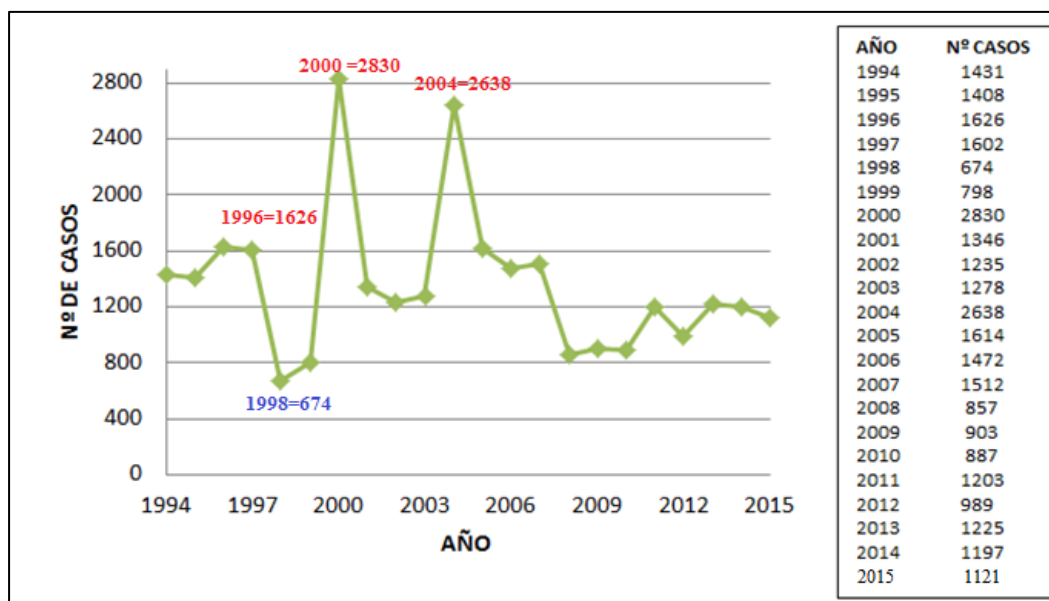


Figura 1. Epidemiología de la Leishmaniasis cutánea en Ecuador 1994-2015 (Anuario de Vigilancia Epidemiológica, 2016).

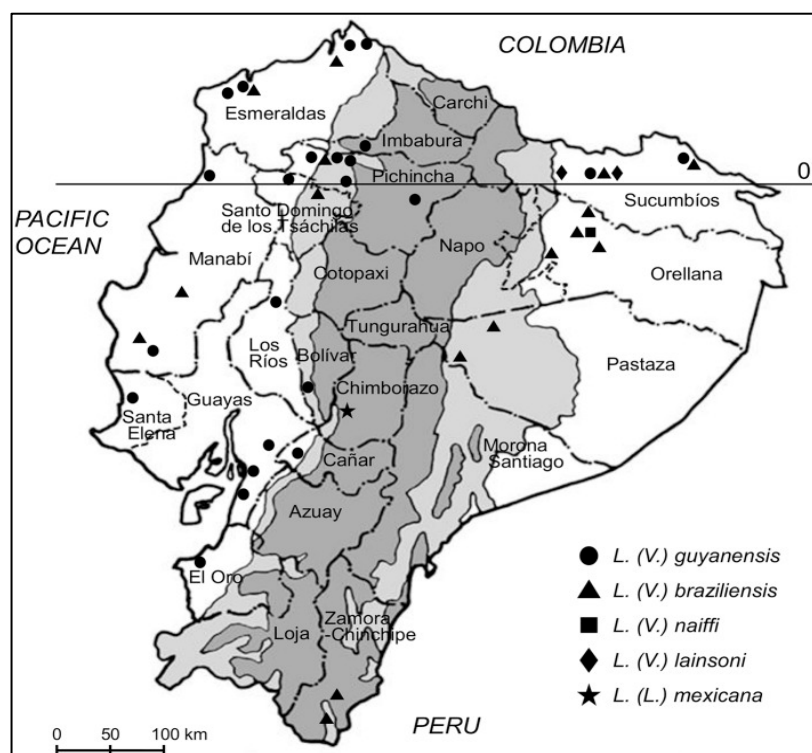


Figura 2. Distribución Geográfica de cinco especies de *Leishmania* en Ecuador. Las áreas de color gris oscuro muestran la meseta andina (> 1.000 m de altitud) y las áreas de color gris claro muestran la selva alta o laderas andinas (400-1.000 m de altitud) (Kato, et al., 2016).

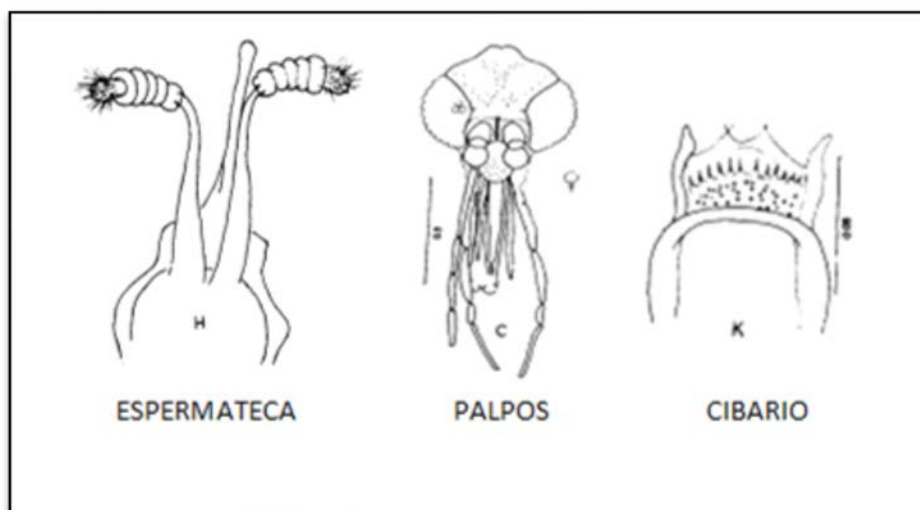


Figura 3. Principales criterios utilizados para la identificación morfológica. Las estructuras corresponden a la especie *Nyssomyia trapidoi* (Young y Duncan, 1994).

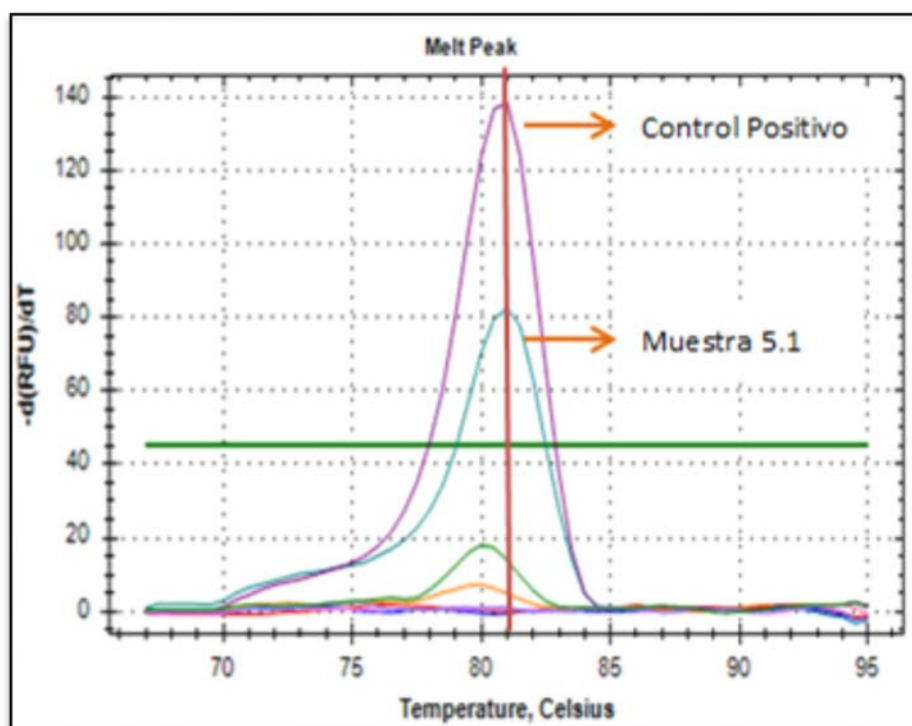


Figura 4. Curva de Derretimiento a 81°C que muestra la presencia de ADN del Kinetoplasto de Tripanosomatidae.



Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de la amplificación de una región conservada de los Minicírculos del Kinetoplasto de *Trypanosomatidae* (3 muestras procesadas).

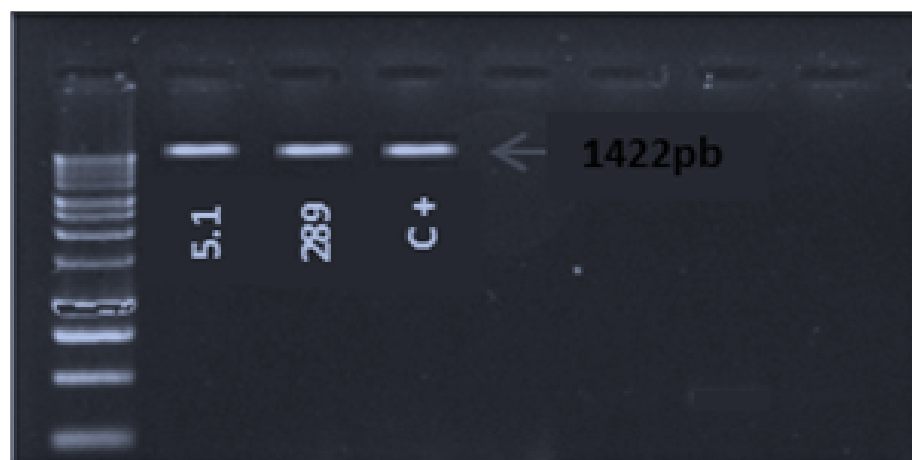


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de la amplificación de un fragmento del gen de la proteína del Shock Térmico (2 muestras). El control positivo fue la muestra de una lesión de Leishmaniasis cutánea.

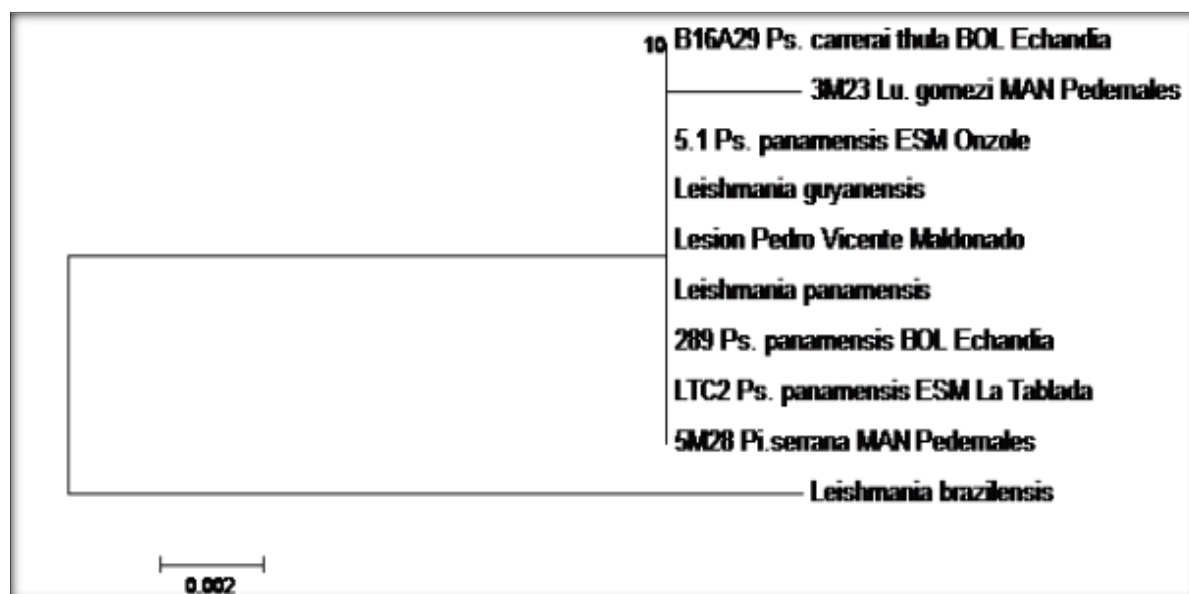


Figura 7. Árbol filogenético obtenido a través del método Neighbor-Joining para determinar la especie de *Leishmania* que infecta al vector y posible vector.

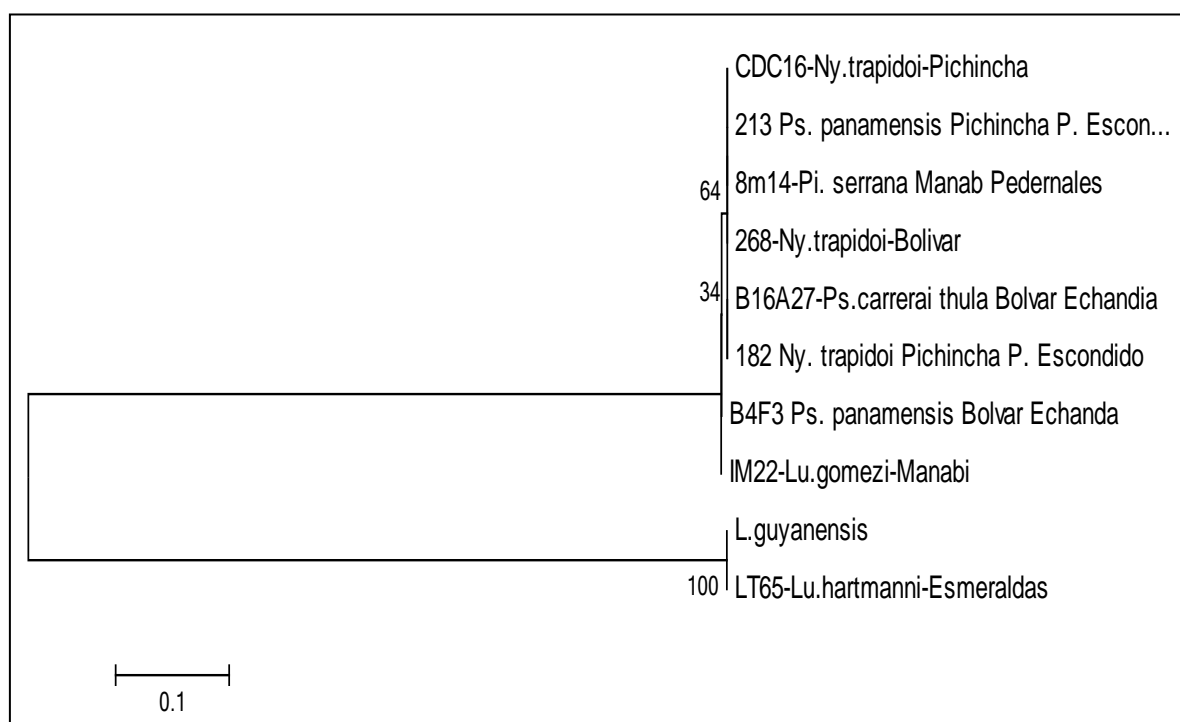


Figura 8. Árbol filogenético obtenido a través del método Neighbor-Joining para determinar que parasito infecta al vector y posible vector (Muestra CDC16 es un *Endotrypanum* confirmado).